

Intraspezieshybridome (Ratte x Ratte)  
und ihre Eignung zur  
Gewinnung monoklonaler Antikörper  
gegen Rattenglione

Margarete Steinecke

*Diss. München  
1984*







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41554004\\_0060](https://archive.org/details/IA41554004_0060)

Aus dem Institut für Tierpathologie der  
Universität München  
Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Prof. Dr. D. Stavrou

Intraspezieshybridome (Ratte x Ratte) und ihre Eignung zur  
Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen Rattengliome

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Margarete Steinecke  
aus  
Nordhausen  
München 1984

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl  
Referent: Prof. Dr. D. Stavrou  
Korreferent: Prof. Dr. U. Lösch

Tag der Promotion: 24. Februar 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH  
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung

1. Entstehung und Bedeutung meiner Mutter

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| 1.1. Entstehung               | 1 |
| 1.2. Bedeutung                | 2 |
| 1.3. Entstehung und Bedeutung | 3 |
| 1.4. Entstehung und Bedeutung | 4 |
| 1.5. Entstehung und Bedeutung | 5 |
| 1.6. Entstehung und Bedeutung | 6 |
| 1.7. Entstehung und Bedeutung | 7 |
| 1.8. Entstehung und Bedeutung | 8 |

2. Entstehung

3. Entstehung und Bedeutung

|                                 |     |
|---------------------------------|-----|
| 3.1. Entstehung und Bedeutung   | 10  |
| 3.2. Entstehung und Bedeutung   | 11  |
| 3.3. Entstehung und Bedeutung   | 12  |
| 3.4. Entstehung und Bedeutung   | 13  |
| 3.5. Entstehung und Bedeutung   | 14  |
| 3.6. Entstehung und Bedeutung   | 15  |
| 3.7. Entstehung und Bedeutung   | 16  |
| 3.8. Entstehung und Bedeutung   | 17  |
| 3.9. Entstehung und Bedeutung   | 18  |
| 3.10. Entstehung und Bedeutung  | 19  |
| 3.11. Entstehung und Bedeutung  | 20  |
| 3.12. Entstehung und Bedeutung  | 21  |
| 3.13. Entstehung und Bedeutung  | 22  |
| 3.14. Entstehung und Bedeutung  | 23  |
| 3.15. Entstehung und Bedeutung  | 24  |
| 3.16. Entstehung und Bedeutung  | 25  |
| 3.17. Entstehung und Bedeutung  | 26  |
| 3.18. Entstehung und Bedeutung  | 27  |
| 3.19. Entstehung und Bedeutung  | 28  |
| 3.20. Entstehung und Bedeutung  | 29  |
| 3.21. Entstehung und Bedeutung  | 30  |
| 3.22. Entstehung und Bedeutung  | 31  |
| 3.23. Entstehung und Bedeutung  | 32  |
| 3.24. Entstehung und Bedeutung  | 33  |
| 3.25. Entstehung und Bedeutung  | 34  |
| 3.26. Entstehung und Bedeutung  | 35  |
| 3.27. Entstehung und Bedeutung  | 36  |
| 3.28. Entstehung und Bedeutung  | 37  |
| 3.29. Entstehung und Bedeutung  | 38  |
| 3.30. Entstehung und Bedeutung  | 39  |
| 3.31. Entstehung und Bedeutung  | 40  |
| 3.32. Entstehung und Bedeutung  | 41  |
| 3.33. Entstehung und Bedeutung  | 42  |
| 3.34. Entstehung und Bedeutung  | 43  |
| 3.35. Entstehung und Bedeutung  | 44  |
| 3.36. Entstehung und Bedeutung  | 45  |
| 3.37. Entstehung und Bedeutung  | 46  |
| 3.38. Entstehung und Bedeutung  | 47  |
| 3.39. Entstehung und Bedeutung  | 48  |
| 3.40. Entstehung und Bedeutung  | 49  |
| 3.41. Entstehung und Bedeutung  | 50  |
| 3.42. Entstehung und Bedeutung  | 51  |
| 3.43. Entstehung und Bedeutung  | 52  |
| 3.44. Entstehung und Bedeutung  | 53  |
| 3.45. Entstehung und Bedeutung  | 54  |
| 3.46. Entstehung und Bedeutung  | 55  |
| 3.47. Entstehung und Bedeutung  | 56  |
| 3.48. Entstehung und Bedeutung  | 57  |
| 3.49. Entstehung und Bedeutung  | 58  |
| 3.50. Entstehung und Bedeutung  | 59  |
| 3.51. Entstehung und Bedeutung  | 60  |
| 3.52. Entstehung und Bedeutung  | 61  |
| 3.53. Entstehung und Bedeutung  | 62  |
| 3.54. Entstehung und Bedeutung  | 63  |
| 3.55. Entstehung und Bedeutung  | 64  |
| 3.56. Entstehung und Bedeutung  | 65  |
| 3.57. Entstehung und Bedeutung  | 66  |
| 3.58. Entstehung und Bedeutung  | 67  |
| 3.59. Entstehung und Bedeutung  | 68  |
| 3.60. Entstehung und Bedeutung  | 69  |
| 3.61. Entstehung und Bedeutung  | 70  |
| 3.62. Entstehung und Bedeutung  | 71  |
| 3.63. Entstehung und Bedeutung  | 72  |
| 3.64. Entstehung und Bedeutung  | 73  |
| 3.65. Entstehung und Bedeutung  | 74  |
| 3.66. Entstehung und Bedeutung  | 75  |
| 3.67. Entstehung und Bedeutung  | 76  |
| 3.68. Entstehung und Bedeutung  | 77  |
| 3.69. Entstehung und Bedeutung  | 78  |
| 3.70. Entstehung und Bedeutung  | 79  |
| 3.71. Entstehung und Bedeutung  | 80  |
| 3.72. Entstehung und Bedeutung  | 81  |
| 3.73. Entstehung und Bedeutung  | 82  |
| 3.74. Entstehung und Bedeutung  | 83  |
| 3.75. Entstehung und Bedeutung  | 84  |
| 3.76. Entstehung und Bedeutung  | 85  |
| 3.77. Entstehung und Bedeutung  | 86  |
| 3.78. Entstehung und Bedeutung  | 87  |
| 3.79. Entstehung und Bedeutung  | 88  |
| 3.80. Entstehung und Bedeutung  | 89  |
| 3.81. Entstehung und Bedeutung  | 90  |
| 3.82. Entstehung und Bedeutung  | 91  |
| 3.83. Entstehung und Bedeutung  | 92  |
| 3.84. Entstehung und Bedeutung  | 93  |
| 3.85. Entstehung und Bedeutung  | 94  |
| 3.86. Entstehung und Bedeutung  | 95  |
| 3.87. Entstehung und Bedeutung  | 96  |
| 3.88. Entstehung und Bedeutung  | 97  |
| 3.89. Entstehung und Bedeutung  | 98  |
| 3.90. Entstehung und Bedeutung  | 99  |
| 3.91. Entstehung und Bedeutung  | 100 |
| 3.92. Entstehung und Bedeutung  | 101 |
| 3.93. Entstehung und Bedeutung  | 102 |
| 3.94. Entstehung und Bedeutung  | 103 |
| 3.95. Entstehung und Bedeutung  | 104 |
| 3.96. Entstehung und Bedeutung  | 105 |
| 3.97. Entstehung und Bedeutung  | 106 |
| 3.98. Entstehung und Bedeutung  | 107 |
| 3.99. Entstehung und Bedeutung  | 108 |
| 3.100. Entstehung und Bedeutung | 109 |



## Inhaltsübersicht

|                                                                 | Seite |
|-----------------------------------------------------------------|-------|
| A. Einleitung                                                   | 1     |
| B. Literaturübersicht                                           | 3     |
| I. Antigenität von Gliomzellen                                  | 3     |
| II. Monoklonale Antikörper                                      | 6     |
| 1. Zelllinien                                                   | 6     |
| 2. Hybridogene                                                  | 7     |
| 3. Fusion                                                       | 9     |
| 4. "Feeder-layer"                                               | 10    |
| 5. Transplantation                                              | 11    |
| C. Problematik                                                  | 13    |
| D. Eigene Untersuchungen                                        | 14    |
| I. Material und Methoden                                        | 14    |
| 1. Versuchstiere                                                | 14    |
| 2. Zellmaterial                                                 | 14    |
| 2.1. Permanente Zellkulturen                                    | 14    |
| 2.1.1. Rattengliomzellen                                        | 14    |
| 2.1.2. Rattenmyelomzellen                                       | 15    |
| 2.1.3. Kaninchengliomzellen                                     | 15    |
| 2.2. Rattenhirn- und Nierenzellen                               | 16    |
| 2.3. Mäuseperitonealzellen                                      | 17    |
| 3. Konservierung der Zellen und Hybridom-<br>antikörperlösungen | 17    |
| 4. Immunisierung                                                | 18    |
| 5. Zellfusion                                                   | 20    |

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6. Immunologische Untersuchungen zum Nachweis der gliombindenden Antikörper                                | 23 |
| 6.1. Indirekte Immunperoxidasefärbung (IPF)                                                                | 23 |
| 6.2. Enzyme-linked-immunosorbent-assay (micro-ELISA)                                                       | 24 |
| 6.3. Indirekte Immunofluoreszenz (IF)                                                                      | 26 |
| 7. Klonierung der Hybridome                                                                                | 26 |
| 8. Intraperitoneale Produktion von Antikörpern                                                             | 27 |
| 9. Produktion von serumfreiem Hybridomkultur-überstand                                                     | 28 |
| 10. Immunglobulinanreicherung durch Ammonium-sulfatpräzipitation                                           | 28 |
| 11. Agargel-Immunodiffusionstest                                                                           | 29 |
| 12. Absorptionsversuche                                                                                    | 29 |
| II. Ergebnisse                                                                                             | 30 |
| 1. Fusionen                                                                                                | 30 |
| 2. Klonierung der antikörperproduzierenden Hybridome                                                       | 32 |
| 3. Monoklonale Antikörper, die normale syngene Rattenzellen nicht erkannten                                | 37 |
| 4. Kreuzreaktionen der monoklonalen Antikörper mit weiteren chemisch induzierten Rattenglomen              | 40 |
| 5. Kreuzreaktionen selektierter monoklonaler Antikörper mit chemisch induzierten Kaninchen-gliomzelllinien | 40 |
| 6. Immunodiffusion                                                                                         | 44 |
| 7. Immunofluoreszenz-Test                                                                                  | 44 |
| 8. Quantitative Absorption                                                                                 | 44 |
| 9. Intraperitoneale Transplantation von Hybridomen                                                         | 46 |

|                         | Seite |
|-------------------------|-------|
| E. Diskussion           | 47    |
| F. Zusammenfassung      | 53    |
| G. Summary              | 54    |
| F. Literaturverzeichnis | 55    |



## A. EINLEITUNG

Vorbedingung für eine immunologische Abwehrreaktion gegen Tumoren sind tumorassoziierte Antigene, die von nahezu allen spontanen bzw. experimentell induzierten Tumoren exprimiert werden (Baldwin et al.; 1976).

Auch bei Tumoren des Zentralnervensystems konnten gliomassoziierte Antigene nachgewiesen werden, die zelluläre und humorale Abwehrreaktionen des Tumorträgers hervorrufen (Neuwelt et al.; 1978; Lim et al.; 1972; Day et al.; 1973; Stavrou et al.; 1977; 1978a; 1978b; Cravioto, 1978). Da die Gliomzellen jedoch viele unterschiedliche Determinanten aufweisen, stellen sich in vivo gewonnene Gliomantisera als äußerst heterogen dar. Solche durch Immunisierung von Individuen mit den entsprechenden Antigenen erzeugte polyklonale Antiseren erlauben weder eine allgemein gültige Standardisierung, noch sind sie in einer exakt gleichen Zusammensetzung der einzelnen Komponenten beliebig reproduzierbar.

Aus diesem Grund erhebt sich die Forderung nach genau definierbaren, monoklonalen Antiseren, die ausschließlich mit einem Antigen bzw. einer Antigen determinante reagieren. Die Etablierung einer Methode, monoklonale Antikörper in vitro herzustellen, war die Voraussetzung, um gliomassoziierte Antigenstrukturen näher untersuchen zu können. Die Tatsache, daß jeder antikörperbildende B-Lymphozyt bzw. jede Plasmazelle Antikörper einer einzigen Spezifität produziert (Burnet, 1959), wurde von Köhler und Milstein (1975) aufgegriffen. Es gelang ihnen, Antigen-sensibilisierte Milzzellen von Mäusen mit Myelomzellen zu verschmelzen. Die dadurch gewonnenen Hybridome sind permanent in vitro kultivierbar. Aus jeder einzelnen Hybridzelle läßt sich

ein Klon züchten, dessen Zellen alle den gleichen gegen eine Antigendeterminante gerichteten Antikörper herstellen. Die Produktion monoklonaler Antikörper gegen gliomassoziierte Antigene in einem klar definierten syngenem Rattensystem ermöglicht Untersuchungen mit dem Ziel, die Gliomantigene zu charakterisieren, die Heterogenität von Gliomen zu analysieren und darüberhinaus Gliome in vivo darzustellen.

## B. LITERATURÜBERSICHT

### I. Antigenität von Gliomzellen

Das Vorhandensein tumorassoziierter Antigene bei spontan entstandenen Hirntumoren des Menschen konnte durch zahlreiche Untersuchungen wahrscheinlich gemacht werden (Trouillas, 1971; Coakham, 1974; Wahlström et al.; 1974; Kornblith et al.; 1974; Sheikh et al.; 1977; Woosley et al.; 1977; Wikstrand et al.; 1977; de Tribolet et al.; 1980). Chemisch induzierte neurogene Neoplasmen bewirken ebenfalls zelluläre und/oder humorale Immunreaktionen des Organismus (Lim et al.; 1972; Tho et al.; 1974; Cornain et al.; 1975; Stavrou et al.; 1976; Rainbird et al.; 1977; Stavrou et al.; 1977; 1978a; Cravioto, 1978; Spence et al.; 1979; Stavrou et al.; 1980; 1982). Aufgrund der Beobachtung lymphozytärer Infiltrationen in Tumorgewebe (Ridley et al.; 1971; Stavrou et al.; 1977; Wood, 1979) und deutlich erhöhter Makrophagenzahlen in Gliomen (Moranz et al.; 1979) wurde vermutet, daß den zellulären Antikörpern bei der immunologischen Auseinandersetzung zwischen Gliom und Gliomträger eine entscheidende Bedeutung zukommt. Mit Hilfe des "colony inhibition"-Testes und des Mikrozytotoxizitäts-Testes konnte diese lymphozytenvermittelte Zytotoxizität bei spontan entstandenen und experimentell erzeugten Gliomen näher untersucht werden (Kumar et al.; 1973; Wahlström et al.; 1973; Hirt et al.; 1976; Woosley et al.; 1977; Bilzer et al.; 1981).

Auch die humorale Immunantwort, die von spontanen oder chemisch induzierten Tumoren ausgelöst wird, wurde von einigen Autoren zum Nachweis tumorassoziierter Antigene herangezogen (Kornblith et al.; 1974; Stavrou et al.; 1978; Pfreundschuh et al.; 1981).

Um Antigenstrukturen der Tumorzellen besser analysieren zu können, führten Wikstrand et al. (1979) und Schnegg et al. (1981) Absorptionsversuche mit verschiedenen normalen und malignen Zellen durch und entdeckten dabei sowohl Antigene, die von allen Zellen neuroektodermalen Ursprungs exprimiert werden, als auch solche, die Gliomen, adultem und fetalem Hirn eigen sind, und solche Antigene, die ausschließlich von Gliomen exprimiert werden. Ähnliche Ergebnisse erhielten Fields et al. (1975) bei chemisch induzierten Tumoren des Nervensystems.

Bei Hirntumoren wie auch bei anderen Tumoren des Menschen konnten außerdem kreuzreagierende Antigene ermittelt werden (Coakham, 1974; Kornblith et al.; 1974; Wahlström et al.; 1974; Wikstrand et al.; 1977; Pfreundschuh et al.; 1978; Coakham et al.; 1980). Während Herbermann (1977) Kreuzreaktionen bei chemisch induzierten Neoplasmen als selten erachtet, konnten kreuzreagierende Antigene von Steele et al. (1974) und Hellström et al. (1978) auch hier beobachtet werden.

Durch die Entwicklung der Hybridomtechnologie war es möglich, monoklonale Antikörper gegen gliomassozierte Antigene zu produzieren und so ihre Existenz zweifelsfrei nachzuweisen. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper konnten tumorassozierte Antigene nicht nur bei Gliomen des Menschen festgestellt werden (Schnegg et al.; 1981; Seeger et al.; 1981; Wikstrand et al.; 1982; Coakham et al.; 1982; Seeger, 1982; de Tribolet et al.; 1982; Phillips et al.; 1982; de Muralt et al.; 1982), sondern auch an Kolorektalkarzinomen (Herlyn et al.; 1979; Koprowski et al.; 1979) und Lungenkarzinomen (Minna et al.; 1981). Darüberhinaus konnten gemeinsame neuroektodermale Antigene bei Melanomen (Koprowski et al.; 1978; Herlyn et al.; 1979; 1980; Yeh et al.; 1981; Carrel et al.; 1982),

Gliomen und Neuroblastomen (Kennett et al.; 1979; Schnegg et al.; 1981; Seeger et al.; 1981; Carrel et al.; 1982; Sikora et al.; 1982; de Muralto et al.; 1982) nachgewiesen werden.

## II. Monoklonale Antikörper

### 1. Zelllinien

Die Tatsache, daß Myelome Immunglobuline sezernieren (Cohn, 1967; Potter, 1972) und Myelomzellen in vitro kultivierbar sind, macht sie zum geeigneten Partner bei der Produktion von Zellhybriden. Von Nachteil ist jedoch, daß die Myelomzellen weder in vivo noch in vitro gegen ein bestimmtes Antigen zu stimulieren sind und daß sie Antikörper unbekannter Spezifität produzieren (Potter, 1978). Es sind keine Antigene bekannt, mit denen diese Myelomantikörper Bindungen eingehen (Cohn, 1967; Secher, 1980). Milzzellen dagegen produzieren nach Stimulation mit einem bestimmten Antigen die entsprechenden monoklonalen Antikörper (Lefkovits, 1972) - diese Tatsache konnte durch kurzzeitige Kultivierung von Milzzellen in vitro nachgewiesen werden (Klinman et al.; 1976; Singh et al.; 1979) - können jedoch nicht über längere Zeit in vitro am Leben erhalten werden.

Die Verschmelzung einer sensibilisierten Milzzelle mit einer Myelomzelle nach der von Köhler und Milstein (1975) entwickelten Hybridisierungstechnik führt zu einer Hybridzelle, die zeitlich und mengenmäßig unbegrenzt monoklonale Antikörper gegen ein bekanntes Antigen produziert. Da Myelome kein seltenes Ereignis bei vielen Spezies darstellen, konnten Myelomzelllinien von Mäusen (Horibata et al.; 1970) und Varianten hiervon, die entweder keine Immunglobuline mehr sezernieren oder synthetisieren (Köhler et al.; 1976; Shulman et al.; 1978; Kearney et al.; 1979) etabliert werden.

Seit kurzem stehen auch Myelomzelllinien vom Menschen zur Verfügung, die jedoch alle Antikörper produzieren (Croce et al.; 1980; Olsson et al.; 1980; Edwards, 1981). Die Rattenmyelomlinie R 210 wurde von Burtonboy et al. (1973)

aus dem Rattenmyelom S 210 (Bazin et al.; 1972) in vitro adaptiert. Die Etablierung der Azaguanin-resistenten Sublinie 210 RC  $Y_3$  Ag1 schuf die Voraussetzung, um eine erste erfolgreiche Fusion zwischen diesen Rattenmyelomzellen und der Immunglobulin-produzierenden Mäusemyelomzelllinie P1 Bu 1 durchzuführen (Cotton et al.; 1973). Allerdings konnte erst nach einer zweimaligen Klonierung der 210 RC  $Y_3$  Ag1 - Zellen ein Klon selektiert werden, dessen Zellen - nun als  $Y_3$  Ag1.2.3 bezeichnet - sich für eine Fusion mit Milzzellen normaler oder immunisierter Ratten eigneten (Galfré et al.; 1979). Die daraus resultierenden Hybridome produzieren nicht nur die Immunglobuline der zuvor antigenstimulierten Milzzelle, sondern auch die leichte kappa-Kette der  $Y_3$  Ag1.2.3-Zelle. Da diese Heterogenität der Hybridomantikörper unerwünscht ist, gelang es Bazin (1982), die Rattenmyelomzelllinie IR 983 F zu entwickeln, die als "non-producer" keine Ketten sezerniert. Die Fusionseffizienz dieser Zelllinie liegt bei einer Hybridzelle/ $10^6$  Milzzellen und ist damit Mäusemyelomlinien vergleichbar (Yelton et al.; 1980).

## 2. Hybridogene

Hybridzellen, die durch Spontanfusion in vitro entstehen (Barski et al.; 1961), stellen ein so seltenes Ereignis dar, daß Substanzen gesucht wurden, die zu einer Erhöhung der Fusionsrate von Zellen führten. Das dabei entdeckte inaktivierte Sendaivirus galt zunächst als geeigneter Fusionsvermittler (Harris et al.; 1965; Neff et al.; 1968), wurde aber aufgrund von Problemen mit Produktion, Lagerung und unterschiedlichen Chargenaktivitäten und dem Un-

vermögen einiger Zelllinien, mit Sendaivirus als Fusionsvermittler Hybridome zu erzeugen, aufgegeben. Mit Polyäthylenglykol (PEG) als Hybridogen erzielte Pontecorvo (1975) ähnliche Ergebnisse wie mit Sendaivirus. Davidson et al. (1976) konnten die Anwendung des zelltoxischen PEGs vereinfachen und die Fusionsrate erhöhen. Klebe et al. (1981) fanden bei der Untersuchung von 118 Substanzen 20 heraus, die einen vergleichbaren günstigen Einfluß auf die Entstehung von Hybridomen hatten wie PEG. Übereinstimmend wurde festgestellt, daß das Molekulargewicht des PEGs innerhalb bestimmter Grenzen - 400 bis 3000 (Klebe et al.; 1981) und 1000 bis 6000 (Davidson et al.; 1976) - keine Rolle spielt, dagegen ist die Konzentration des PEGs von großer Bedeutung für den Fusionserfolg. Optimale Ergebnisse lassen sich mit einer 50%igen PEG-Lösung erreichen. Norwood et al. (1976) untersuchten Veränderungen der PEG-Wirkung nach Zugabe von 5, 10, 15 und 20 Prozent Dimethylsulfoxid (DMSO). Da DMSO stark hydrophil ist und eine gute Strahlen- und Kälteschutzwirkung besitzt (Ashwood-Smith, 1971) gingen die Autoren davon aus, daß es durch die Zytoplasmamembranveränderungen zu einer engeren Zelloberflächenverbindung mit der PEG-Lösung kommen könnte, wodurch sich die Fusionsrate erhöhen würde. Ein Versuch mit 44 % PEG (MG 6000), dem 10 % DMSO zugefügt worden war, brachte nach einminütiger Einwirkungszeit eine große Anzahl vitaler Hybridzellen. Über die günstigste Einwirkungsdauer der PEG-Lösung auf die Zellen bestehen unterschiedliche Auffassungen. Sie variieren von 12 - 30 Sekunden bzw. 60 Sekunden (Davidson et al.; 1976), 120 Sekunden (Galfré et al.; 1977) und 5 - 15 Minuten (Pontecorvo, 1975).

Dagegen herrscht Übereinstimmung bei der Beurteilung des pH-Wertes während der Zellfusion. Das pH-Optimum liegt im alkalischen Bereich (Croce et al.; 1972; Galfré et al.; 1977; Fazekas de St. Groth et al.; 1980). Als günstig hat sich auch die Abwesenheit von  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen während der Fusion erwiesen. Dadurch konnte die Menge an lebensfähigen Hybridzellen gesteigert werden (Schneidermann et al.; 1979).

### 3. Fusion

Der Fusionsvorgang selbst, also das Verschmelzen zweier Zellen unter PEG-Einwirkung, läuft nach Knutton et al. (1979) in drei Stufen ab. Durch den Einfluß des hydrophilen PEGs kommt es zu einer Zellagglutination, an die sich nach der Entfernung des PEGs die Membranfusion anschließt. Diese Verschmelzung der Zellmembranen zieht eine Vergrößerung der nun heterokaryonten Hybridzelle nach sich.

Da sich in dem Kulturgefäß neben den Hybridzellen viele nicht-fusionierte Myelomzellen befinden, käme es aufgrund der zahlenmäßigen Unausgewogenheit von Hybridom- und Myelomzellen - etwa  $1 : 10^5$  - sehr schnell zu einem Überwuchern der Hybridome durch die Tumorzellen. Dieses Problem konnte von Littlefield (1964) durch Entwicklung eines Selektivmediums, das die Zusätze Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält, gelöst werden. Das HAT-Medium erlaubt ausschließlich den Myelom-Milzzellhybriden zu überleben, während alle anderen Zellen absterben. Die Synthese der DNA aus Purin- und Pyrimidinbasen wird durch die Zugabe von Aminopterin unterbunden, da es antagonistisch auf die als Koenzym fungierende Folsäure wirkt.

Die Zelle kann jedoch einen Umweg beschreiten, indem sie aus den Vorstufen Hypoxanthin und Thymidin in Anwesenheit der Enzyme Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) und Thymidin-Kinase (TK) die Nukleotide metabolisiert. HGPRT bewirkt in normalen Zellen außerdem den Einbau von Azaguanin in die DNA, worauf die Zelle stirbt. Durch Selektion von Azaguanin-resistenten Mutanten, das heißt HGPRT-negative Zellen, kann auch der Umweg der DNA-Synthese im HAT-Medium unterbrochen werden. Da Milzzellen *in vitro* grundsätzlich absterben, bei einer Fusion mit HGPRT-negativen Myelomzellen aber die Fähigkeit zur Produktion dieses Enzyms auf die Hybridzellen übertragen, vermögen Hybridzellen als einzige im Selektivmedium zu überleben. Durch diese Methode wird es möglich, eine Hybridzelle aus einer Vielzahl von Zellen herauszufinden. Die Instabilität einiger Hybridomzellen stellt jedoch ein Problem dar. Als Begründung dafür werden zum einen Syntheseverluste der H- oder L-Ketten, gekoppelt mit Chromosomenverlusten (Köhler et al.; 1978; Köhler 1980), zum anderen das Überwuchern der Hybridome durch nicht produzierende Klone (Gerhard et al.; 1978) angegeben. Die Stabilität der Hybridome wird durch frühzeitiges und wiederholtes Klonieren der Antikörper-positiven Kolonien nach dem Soft-Agar-Verfahren (Coffino et al.; 1972), oder der Endpunktverdünnung (Lefkovits, 1972) verbessert.

#### 4. "Feeder-layer"

Von wesentlichem Einfluß auf Entwicklung und Kultivierbarkeit der Hybridome ist die Verwendung eines "feeder-layers". Seine Bedeutung liegt wahrscheinlich in der

Phagozytose von Zelldetritus und Produktion von wachstumsstimulierenden Faktoren (Goding, 1980). Es werden sowohl unbehandelte Milzzellen (Galfré et al.; 1977; Levy et al.; 1978) als auch Makrophagen (Hengartner et al.; 1978; Fazekas de St. Groth et al.; 1980; Bazin, 1982), aber auch Fibroblasten von Ratten (Dean et al.; 1982; North et al.; 1982) und Mäusen (Kennett et al.; 1978) sowie Thymozyten (Lehnhardt et al.; 1978; Hellström et al.; 1980; Hashimoto et al.; 1981) verwendet.

## 5. Transplantation

Die Produktion der Antikörper kann sowohl in vitro als auch in vivo erfolgen. Die Antikörperausbeute aus Kulturüberständen liegt bei 10 - 100 µg/ml (Secher, 1980). Zur Erzielung maximaler Antikörperkonzentrationen ist es möglich, den Hybridomüberstand erst nach dem Zelltod der vollständig dicht bewachsenen Kulturen zu gewinnen (Goding, 1980), oder die Immunglobuline der Kulturüberstände mittels Ammoniumsulfatpräzipitation zu konzentrieren (Fey et al.; 1976).

Die Hybridomzellen lassen sich unter Berücksichtigung der Histokompatibilität von Empfänger und den zu transplantierenden Zellen (Katz et al.; 1976) nach intraperitonealer Applikation als Ascitestumor und nach subkutaner Verabreichung als solider Tumor züchten (Köhler et al.; 1976; Galfré et al.; 1979). Begünstigt wird die Ausbildung eines Ascitestumors durch die Anwendung von Prestane<sup>R</sup> (2,6,10,13-tetramethylpentadecane), von dem 0,5 ml intraperitoneal (Galfré et al.; 1979) einige Wochen vor der Transplantation verabreicht werden (McKearn, 1980).

Nach der Applikation von etwa  $10^7$  Zellen bildet sich nach circa sechs Tagen Ascites. Sowohl die Ascitesflüssigkeit als auch das Serum enthalten 100- bis 1000mal mehr monoklonale Antikörper als der Kulturüberstand, und zwar sind darin 3 - 20 mg Immunglobulin pro ml enthalten.

### C. Problemstellung

Wenngleich es für die Mehrzahl der Autoren als wahrscheinlich gilt, daß nahezu alle spontan entstandenen oder experimentell erzeugten Gliome tumorassoziierte Antigene besitzen, bleibt ihre Existenz, basierend auf der Analyse der polyklonalen Immunantwort, umstritten. Dagegen gelang es mit Hilfe monoklonaler Gliomantikörper, den Nachweis dafür zu erbringen, daß tumorassoziierte Antigene an den Gliomzelloberflächen exprimiert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten unter Verwendung der Splenozyten von Ratten, die mit syngeneten Rattengliomzellen sensibilisiert worden waren und der Rattenmyelomzelllinie Y<sub>3</sub>Ag1.2.3 Intraspezies-Hybridome erzeugt werden. Desweiteren sollte die Fähigkeit dieser Hybridome, monoklonale Antikörper gegen Rattengliome zu produzieren, untersucht werden. Dabei konnte unter den gewählten experimentellen Bedingungen davon ausgegangen werden, daß daraus eine hohe Anzahl von Hybridomen resultieren dürfte, die nur gliombindende Antikörper sezernieren.

Da aufgrund des in dieser Untersuchung verwendeten Tier- bzw. Zellmaterials identische Histokompatibilitätsantigene vorliegen, sollte es ohne besondere immunsuppressive Behandlung möglich sein, nach Transplantation der Hybridzellen in die Bauchhöhle von Ratten, Ascitestumoren zu züchten und mit Antikörpern angereicherte Ascitesflüssigkeit zu gewinnen.

## D. Eigene Untersuchungen

### I. Material und Methoden

#### 1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche und weibliche 4 - 6 Monate alte  $F_1$ -Hybridratten (Fi x Lou), die aus der Kreuzung Fischer (F344) x Lou-Ratten entstammten sowie Lou-Ratten. Die Tiere wurden unter gleichen Bedingungen gehalten und erhielten die Rattenstandarddiät Altromin<sup>R</sup> und Wasser ad libitum.

#### 2. Zellmaterial

##### 2.1. Permanente Zellkulturen

##### 2.1.1. Rattengliomzellen

Bei den folgenden Untersuchungen fanden fünf durch N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff bei Fischer-Ratten induzierte und in vitro etablierte Gliomzelllinien (Stavrou et al. 1980) Verwendung. Sie waren durch die gliaspezifischen Proteine S-100 und GFAP charakterisiert (Tab. 1).

Tabelle 1

#### Zelllinien, etabliert aus chemisch induzierten Rattengliomen

| Bezeichnung<br>des Tumors | Tumortyp                  | Bezeichnung<br>der Zelllinie |
|---------------------------|---------------------------|------------------------------|
| 219/78                    | pleomorphes Gliom         | 78 FR-G-219                  |
| 284/78                    | pleomorphes Mischgliom II | 78 FR-G-284                  |
| 299/78                    | Astrozytom I-II           | 78 FR-G-299                  |
| 344/78                    | pleomorphes Mischgliom II | 78 FR-G-344                  |
| 41/79                     | pleomorphes Astrozytom II | 79 FR-G- 41                  |

Die Kultivierung dieser Gliomzelllinien erfolgte in Nunc<sup>R</sup>-Plastikflaschen bei 37°C im geschlossenen System. Als Kulturmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco 430-2100) verwendet, dem 10% fetales Kälberserum (FKS), Antibiotika (100.000 I.E. Penicillin, 0,1 g Dihydrostreptomycin und 0,1 g Neomycinsulfat) und 10 ml einer 8,8%igen NaHCO<sub>3</sub>-Lösung pro Liter zugefügt worden waren. Die Zellen wurden, ihrer Wachstumsgeschwindigkeit entsprechend, im Verhältnis 1 : 10 bis 1 : 50 durch Trypsinierung geteilt.

#### 2.1.2. Rattenmyelomzellen

Bei allen Fusionen kam die Lou/Wsl-Ratten-Myelomzelllinie Y<sub>3</sub>Ag. 1.2.3 zur Anwendung, die uns freundlicherweise von C. Milstein <sup>\*)</sup> zur Verfügung gestellt wurde. Diese Zelllinie stammt aus dem Lou-Rattenmyelom S210 und wurde von Burtonboy et al. (1973) als permanente Zellkultur etabliert. Die Y<sub>3</sub>Ag1.2.3-Zellen sezernieren leichte Ketten vom kappa-Typ (Bazin et al. 1972), sind azaguaninresistent und Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-negativ (HGPRT<sup>-</sup>). Y<sub>3</sub>Ag1.2.3-Zellen wurden in 260 ml Nunc<sup>R</sup>-Plastikflaschen in einer 5 %igen CO<sub>2</sub> Atmosphäre mit 95 % Luftfeuchtigkeit und 37°C vermehrt. Als Medium diente Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % FKS und einem Zusatz von 15 mg 8-Azaguanin, 100.000 I.E. Penicillin, 0,1 g Neomycin, 0,1 g Streptomycin und 10 ml 8,8 %ige NaHCO<sub>3</sub>-Lösung pro Liter. Die Zellen wurden dreimal wöchentlich abtrypsiniert und im Verhältnis 1:5 geteilt.

#### 2.1.3. Kaninchengliomzellen

Die für Kreuzreaktionen verwendeten Kaninchengliomzelllinien wurden aus Hirntumoren etabliert, die durch intravenöse Injektion von N-methyl-N-Nitrosoharnstoff bei Kaninchen induziert waren (Stavrou, 1970).

<sup>\*)</sup> MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, England

Die folgenden, durch den Nachweis gliaspezifischer Antigene charakterisierten Gliomzelllinien fanden Verwendung (Tab. 2)

Tabelle 2

Zelllinien, etabliert aus chemisch induzierten Kaninchengliomen

| Bezeichnung<br>des Tumors | Tumortyp                | Bezeichnung<br>der Zelllinie |
|---------------------------|-------------------------|------------------------------|
| 381/76                    | Astrozytom II-III       | 76RB-G-381                   |
| 414/76-H                  | Astrozytom II           | 76RB-G-414-H                 |
| 34/77                     | pleomorphes Gliom       | 77RB-G 34                    |
| 58/77                     | Oligodendrogliom II-III | 77RB-G- 58                   |
| 359/77                    | pleomorphes Gliom       | 77RB-G-359                   |

## 2.2. Hirn- und Nierenzellkulturen von Ratten

Neugeborenen, durch Dekapitation getöteten Ratten, wurde das gesamte Hirngewebe sowie beide Nieren steril entnommen. Das Hirngewebe wurde durch mehrmaliges kräftiges Aufsaugen und Ausblasen mit einer Pipette suspendiert, die Nieren dagegen durch ein Sieb mit 60 µm Porengröße gedrückt (Gewebe-Dissoziationsmethode, Paul, 1980) und in Nunc<sup>R</sup>-Plastikflaschen transferiert. Als Nährmedium diente M199, dem 20 % FKS zugegeben wurde. Alle anderen Zusätze entsprachen denen von DMEM. Die Kulturen wurden im geschlossenen System bei 37°C gehalten und nach der Trypsinierungsmethode im Verhältnis 1:2 geteilt.

### 2.3. Mäuseperitonealzellen

Um die Ausbeute von Peritonealzellen zu vergrößern, erhielten adulte Balb/c-Mäuse 3-7 Tage vor ihrer Verwendung eine intraperitoneale Injektion von 1 ml 10 %igem Thioglycollate Medium (Difco Lab. Detroit, Mich., USA; Schimmelpfeng et al. 1980). Die Wirksamkeit von Thioglycollate Medium läßt sich steigern, wenn es vor seiner Anwendung 2 - 3 Monate bei Zimmertemperatur aufbewahrt wird (Mishell, 1980).

Die Mäuse wurden mit Äther narkotisiert und durch Genickdislokation getötet. Nach der unter sterilen Kautelen vorgenommenen Entfernung der Bauchhaut wurden 5 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) in eine Einwegplastikspritze aufgezogen, durch eine weitleumige Kanüle (0,9 x 3,8) in die Bauchhöhle eingebracht und mehrmals vorsichtig aufgesaugt und wieder eingespritzt. Die Spülflüssigkeit wurde in ein silikonisiertes Reagenzglas mit Konus überführt, in Eiswasser gestellt, mit 2 ml kaltem FKS (4°C) unterschichtet und 5 min bei 1000 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden auf eine Dichte von  $1-2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Die Hybridomakulturen erhielten während der gesamten Kultivierungsdauer pro Loch einer Mikroplatte 10 µl und pro Vertiefung einer Linbroplatte 100 µl dieser Zellsuspension als "feeder-layer" zugesetzt.

### 3. Konservierung

Die Myelom- und Hybridomzellen wurden in regelmäßigen Abständen durch Einfrieren konserviert.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden in 1 ml DMEM - das einen Zusatz von 20 % FKS und 10 %

Dimethylsulfoxid (DMSO, Serva, Heidelberg) enthielt - aufgenommen, in ein Nunc<sup>R</sup>-Einfriergefäß gefüllt, bei 4°C vier Stunden vorgekühlt und anschließend bei -90°C eingefroren. (Ashwood-Smith, 1961). Das Auftauen der Zellen erfolgte schockartig in einem Wasserbad von 37°C. Dem Anzuchtmedium wurden 20 % FKS zugesetzt, die Hybridome erhielten außerdem noch Makrophagen als "feeder-layer". Um das DMSO zu entfernen, wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, sobald sich die Zellen am Boden des Kulturgefäßes abgesetzt hatten. Hybridomüberstände und Ascitesflüssigkeiten wurden zur Konservierung mit 0,02 % Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) versetzt und bei 4°C aufbewahrt (Goding, 1980).

#### 4. Immunisierungen

Zur Immunisierung wurden 21 drei bis sechs Monate alte Fi x Lou-Ratten beiderlei Geschlechts verwendet. Bei der Erstimmunisierung erhielten die Tiere entweder subkutan oder intraperitoneal sowohl unbehandelte als auch chemisch modifizierte Zellen der Gliomlinie 78FG-G-344, und zwar jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen. Die Modifikation zur Steigerung der Antigenität erfolgte mit 2,4,6-Trinitrobenzen-sulfonsäure (TNBS, Sigma, München; Lemonnier et al. 1977; Stavrou et al. 1981). Zur Herstellung einer 10 mM TNBS-Lösung wurden 0,2932g TNBS in 100 ml eines 0,05 M Natriumphosphatpuffers (pH 7,4) gelöst. Die mechanisch geernteten Zellen aus dicht gewachsenen "monolayer"-Kulturen wurden 3mal in PBS-A gewaschen, auf eine Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt, mit 1 ml der vorgewärmten TNBS-Lösung vermischt und 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde solange mit PBS-A gewaschen, bis der Überstand keine Gelbfärbung mehr zeigte.

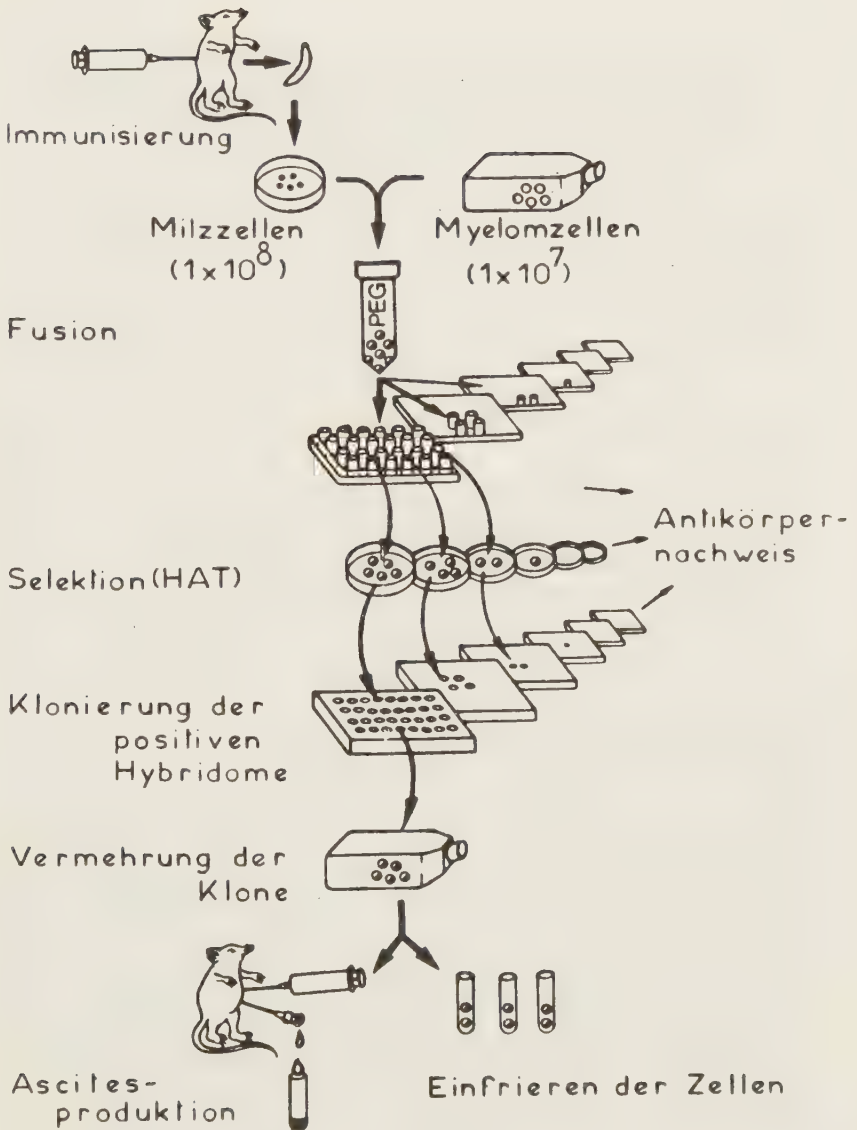


Abb. 1: Schematische Darstellung der Gewinnung von Hybridomen

Die nativen Gliomzellen wurden durch Trypsinierung der "monolayer"-Kulturen gewonnen, in PBS-A gewaschen, auf eine Konzentration von  $5-7 \times 10^6$  Zellen eingestellt und den Tieren intraperitoneal injiziert.

Der Abstand zwischen Grundimmunisierung und Boosterung betrug zwischen einem und vier Monaten. Zur Boosterung wurden  $5 \times 10^6$  native Gliomzellen intraperitoneal appliziert. Die Milz der Tiere wurde entweder drei oder vier Tage nach der letzten Immunisierung zur Fusion entnommen.

## 5. Zellfusion

Die bei der Fusion verwendete Technik entsprach der bei Galfré et al. (1977) und Fazekas de St. Groth et al. (1980) beschriebenen Methode. Dabei wurden Zellen der Rattenmyelomlinie Y<sub>3</sub>Ag1.2.3 mit Milzzellen von immunisierten Fi x Lou-Ratten unter Zugabe einer 50 %igen PEG 4000-Lösung zur Fusion gebracht.

### Vorbereitung der Myelomzellen

Die Myelomzellen wurden 24 Stunden vor der Fusion ab-trypsinisiert, im Verhältnis 1:2 geteilt und mit DMEM / 20 % FKS gefüttert. Für die Fusion wurden nur Zellen verwendet, die in Suspension wuchsen, sich in logarithmischer Wachstumsphase befanden und optimale Lebensfähigkeit aufwiesen.

Zur Zellgewinnung wurden die Kulturgefäße einige Male vorsichtig geschüttelt, um auch die lose am Boden des Kulturgefäßes haftenden Zellen abzulösen und in Suspension zu überführen. Dieser Überstand wurde nun in konisierte Reagenzgläser transferiert und 10 min bei 800 x g zentrifugiert.

Das Zellsediment wurde in 20 ml serumfreien RPMI 1640 Medium (Flow Lab. Bonn) mit Zusatz von 3,5 ml einer 1 %igen Na-EDTA Lösung gewaschen und die Zellkonzentration auf  $10^7$ /ml eingestellt. Die Resuspendierung erfolgte nach 10minütiger Zentrifugation bei  $800 \times g$  in 20 ml desselben Mediums. Ein Teil der Myelomzellen wurde zurückbehalten, um eine HAT-Testreihe anzulegen.

#### Aufbereitung der Milz

Nach Tötung einer immunisierten Fi x Lou-Ratte durch Genickdislokation in Äthernarkose, erfolgte die Entnahme und Zerkleinerung der Milz unter sterilen Bedingungen. Die Milzstückchen wurden mit dem Stempel einer 10 ml-Spritze durch ein Sieb mit  $60 \mu m$  Porenweite unter ständigem Zutropfen von 10 ml DMEM/10 % FKS gedrückt. Die gewonnene Zellsuspension blieb nun 5 Minuten stehen, damit sich größere Milzstückchen absetzen konnten. Der Überstand wurde in ein Zentrifugenröhrchen dekantiert, mit DMEM/10 % FKS auf 20 ml aufgefüllt und 10 min bei  $800 \times g$  zentrifugiert. Das Milzzellpellet wurde in 20 ml serumfreiem RPMI+Na-EDTA aufgenommen, die Zelldichte bestimmt und erneut 10 min bei  $800 \times g$  zentrifugiert.

#### Fusion

Die Milzzellen wurden mit den in 20 ml serumfreiem RPMI/Na-EDTA resuspendierten Myelomzellen im Verhältnis 10:1 ( $1 \times 10^8$  Milz-/ $1 \times 10^7$  Myelomzellen) gut vermischt und 10 min bei  $800 \times g$  zentrifugiert. Danach wurde der Überstand sehr sorgfältig abgesaugt, um ein möglichst trockenes Zellpellet zu erhalten. Auf dieses Zellsediment wurde unter fortwährendem Schütteln 1 ml einer 50 %igen Polyäthylenglycollösung gegeben. Die PEG-Lösung setzte sich aus 3 g geschmolzenem sterilem PEG (MG 4000, Merck, Darmstadt, Nr. 9727), 3 ml sterilem Aqua bidest. und 0,3 ml DMSO

(Dimethylsulfoxid, Serva, Heidelberg) zusammen. Soweit nicht anders angegeben, wurde die Fusion bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei der Einwirkung des PEGs auf das Zellpellet sowie bei der schrittweisen Verringerung der PEG-Konzentration wurde folgender Zeitplan eingehalten.

| Zeit (min) | Behandlung                                |
|------------|-------------------------------------------|
| 1          | Pellet + 1 ml PEG/Aqua bidest/DMSO-Lösung |
| 1,5        | Wasserbad bei 37°C                        |
| 0,5        | 1 ml serumfreies RPMI+Na-EDTA zutropfen   |
| 0,5        | 3 ml serumfreies RPMI+Na-EDTA zutropfen   |
| 1          | 6 ml serumfreies RPMI+Na-EDTA zutropfen   |

Im Anschluß an die letzte PEG-Verdünnung wurden weitere 10 ml serumfreies RPMI+Na-EDTA zugegeben. Nach fünf Minuten Ruhezeit wurde die Zellsuspension 10 min bei 800 x g zentrifugiert.

Das Sediment wurde nun mit 20 ml HAT-Medium versetzt und erneut 10 min bei 800 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 200 ml HAT-Medium aufgenommen und auf vier Linbroplatten mit jeweils 24 Löchern verteilt (2 ml/Loch). Die unbehandelten Myelomzellen fanden in einer HAT-Kontrollreihe Verwendung. Auf den Linbroplatten waren am Vortag Mäuseperitonealzellen als "feeder-layer" ausgesät worden.

Das HAT-Hybridomselektionsmedium setzte sich aus Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 20 % FKS, 10 ml 8,8 %igem  $\text{NaHCO}_3$ , 100 000 I.E. Penicillin, 0,1 g Streptomycin, 0,1 g Neomycin, 10 ml einer 0,04 mM Aminopterin-vorratslösung (Sigma, München) und 10 ml einer gemeinsamen

10 mM Hypoxanthin-1, 6 mM Thymidinvorsatlslösung (Sigma, München) zusammen. Das Bebrüten der Linbroplatten erfolgte bei 37°C und maximaler Luftfeuchtigkeit in einer 5 %igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Der erste Mediumwechsel wurde nach drei Tagen, alle weiteren zweimal pro Woche durchgeführt.

Hybridzellen konnten schon vier Tage nach der Fusion gesehen werden. Sobald sie dicht gewachsen waren, wurden die Kulturüberstände einem ersten Immunperoxidase-Test unterzogen und die Zellen aus Löchern mit positivem Ergebnis kloniert. Zwei bis drei Wochen später, wenn die Hybridomzellen stabiles Wachstum zeigten und in der HAT-Testreihe keine Myelomzelle mehr am Leben war, wurde das HAT-Medium durch aminopterinfreies HT-Medium ersetzt. Später wurde auch das Hypoxanthin-Thymidin weggelassen. Der Serumanteil des Mediums konnte, gutes Hybridomwachstum vorausgesetzt, auf 12 % reduziert werden.

## 6. Immunologische Untersuchungsmethoden zum Nachweis gliombindender Antikörper

### 6.1 Indirekte Immunperoxidasefärbung (IPF)

Der Nachweis Immunglobulin-produzierender Hybridome wurde nach der Fusion mit Hilfe der Immunperoxidasefärbung geführt.

Die als Targetzellen verwendeten Gliomzellen wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn in einer Konzentration von 500-1000 Zellen pro Loch auf Terasaki-Platten ausgesät (Pateraki, 1981). Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen einmal mit temperiertem PBS-A gewaschen und 5 min

mit Methanol/Aceton 1:1, 4°C, fixiert. Nach mindestens 10 min Lufttrocknung wurden 10 µl Hybridomüberstand als erster Antikörper in jedes Loch pipettiert und die Platten zugedeckt eine Stunde bei 37°C inkubiert. Als positive Kontrolle diente 1:20 verdünntes Serum derjenigen Ratten, deren Milzzellen bei der entsprechenden Fusion verwendet wurden; als negative Kontrolle Kulturüberstand von Y<sub>3</sub>Ag1.2.3. Anschließend wurde dreimal mit PBS-A gewaschen, 10-20 min inkubiert und erneut dreimal gewaschen. Als zweiter Antikörper wurde ein Meerrettich-Peroxidase-konjugiertes Kaninchen-anti-Ratten Immunglobulin (Dako, Kopenhagen), 1:100 in PBS-A/5 % FKS verdünnt und jeweils 20 µl pro Plattenvertiefung aufgetragen. Die sich anschließenden Waschungen und Inkubationen wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

Zur Darstellung des Antigen-Antikörperkomplexes fand das Substrat nach Nexø (1977) Verwendung. Dafür wurden 20 mg 3-amino-2-äthyl Carbazol (Sigma, München) in 5 ml Dimethylformamid (Merck, Darmstadt) gelöst, in 95 ml 50 mM Acetatpuffer, pH 5, aufgenommen und filtriert. Unmittelbar vor Gebrauch der Lösung wurden 50 µl 30 %iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugefügt. Nach einer Einwirkzeit von 10 min waren die positiv reagierenden Zellen in den Mikrolöchern makroskopisch deutlich an ihrer rotbraunen Färbung zu erkennen und die Platten wurden gründlich in Aqua bidest. gewaschen.

Bei der lichtmikroskopischen Auswertung wurden die Klassifizierungsgrade stark positiv, positiv, schwach positiv und negativ verwendet.

## 6.2 Enzyme-linked-immunosorbent-assay (micro-ELISA)

Das Anzüchten der Targetzellen erfolgte 24 Stunden vor Versuchsbeginn auf flexiblen 96-Loch-Mikroplatten (Flow-Lab. Bonn Nr. 76-381-04). Fixiert wurden sie 5 min mit

4°C kaltem Äthanol/Aceton 1:1 (Suter et al. 1980). Der weitere Ablauf des Testes richtete sich nach den bei Posner et al. (1982) beschriebenen Methode. Auf die Zellen wurde pro Plattenvertiefung 20 µl Hybridomkulturüberstand als erster Antikörper pipettiert und 30 min bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-A/5 % FKS wurden die Zellen mit 50 µl des zweiten Antikörpers, einem 1:100 verdünnten Kaninchen-anti-Ratte-Immunglobulin, das mit Meerrettichperoxidase konjugiert war (Dako, Kopenhagen), überschichtet. Nach einer halbstündigen Inkubation bei 4°C und anschließendem sechsmaligen Waschen wurden 100 µl Substrat in jedes Loch gegeben. Das Substrat bestand aus 1 mg/ml ortho-Phenylendiamin (Sigma, München), gelöst in 0,1 M Citratpuffer (pH 4,5) und 4 µl/ml einer 3%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung. Die Ablesung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 492 nm nach einer Reaktionszeit von 30 min mit dem Photometer Titertek<sup>R</sup>, Multiscanner MC (Flow Lab., Bonn). Zur Ermittlung des Leerwertes wurde die erste senkrechte Reihe der Mikroplatte an Stelle des zweiten Antikörpers mit PBS-A behandelt. Als positive Kontrolle diente Serum von Ratten, die mit 78FR-G-344 immunisiert worden waren. Zur Beurteilung des Tests wurde der mit dem Faktor 2 versehene Negativkontrollwert (NKW) herangezogen, d.h. alle Werte über 2 x NKW gelten als positiv. Zur Ermittlung des Negativkontrollwerts diente Kulturüberstand von Y<sub>3</sub>Ag1.2.3.-Zellen.

### 6.3 Indirekte Immunofluoreszenz

Die Darstellung fluoreszierender Antikörper in den Hybridom-überständen erfolgte durch die indirekte Immunofluoreszenz-Technik (Sandwich-Technik nach Coons, 1957). 2 bis 3 Tage vor dem Test wurden die Zellen auf Glaslamellen ("cover-slips") in "Leighton-tubes" ausgesät. Die subkonfluenten Kulturen wurden zum einen unfixiert verwendet, zum anderen mit 4°C kaltem Aceton fixiert. Die Zellen wurden mit Hybridomüberstand als ersten Antikörper überschichtet und bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach 30 min wurden die Lamellen 3x5 min in PBS-A gewaschen, getrocknet und weitere 30 min bei 37°C mit dem zweiten Antikörper - einem Fluoresceinisothiocyanat-konjugierten Kaninchen-anti-Ratten Immunglobulin (Verdünnung 1:10, Dako, Kopenhagen) - inkubiert. Anschließend wurden die Präparate 3mal in PBS-A gewaschen und mit gepuffertem Glycerol eingeschlossen. Als Kontrollen dienten Lamellen, die mit Myelomzellüberstand und Rattenserum inkubiert worden waren.

### 7. Klonierung der Hybridome

Die Antikörper-produzierenden Hybridomkolonien wurden mit Hilfe der Endpunktverdünnungsmethode (Goding, 1980) so bald wie möglich kloniert, um ein Überwachsen durch nicht-produzierende Hybridomzellen zu verhindern. Dazu wurden von jedem positiven Hybridom Verdünnungsreihen angelegt und zwar derart, daß pro ml HT-Medium  $1 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^2$  und  $1 \times 10^2$  Zellen enthalten waren. Von dieser Zellsuspension wurden pro Vertiefung einer 96-Loch Mikrotiterplatte (Nunc) 10 µl verteilt. Das Klonieren geschah unter Verwendung

von Mäuseperitonealzellen als "feeder-layer" (Hengartner et al. 1978). Sobald die Löcher dicht mit Zellen bewachsen waren, wurden die Überstände durch eine Immunperoxidase-Färbung getestet und die positiven Kulturen noch zweimal auf gleiche Weise kloniert. Wenn die Ausbeute an positiven Vertiefungen nach dreimaligem Klonieren 100 % betrug, wurden von jeder primären Hybridomkultur drei Klone in Linbro-Löcher überführt und dort bei 37°C in einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre weiter gezüchtet. Diese Klone wurden von Zeit zu Zeit einer erneuten Klonierung unterworfen, um die Antikörperproduktion stabil zu halten.

#### 8. Intraperitoneale Antikörperproduktion

Zur Gewinnung großer Mengen von antikörperhaltiger Ascitesflüssigkeit wurden  $1 \times 10^6$  produzierende, stabil und makrophagenfrei wachsende Hybridomzellen in die Bauchhöhle erwachsener Lou-Ratten injiziert.

Ein Teil der Tiere war mindestens drei Wochen vorher mit 1 ml Prestane<sup>R</sup> (2,6,10,14 Tetramethylpentadecane, Ega-Chemie, Steinheim) behandelt worden (McKearn, 1980). Der andere Teil der Tiere erhielt die Hybridomzellen ohne Vorbehandlung intraperitoneal transplantiert. Nach 6-14 Tagen wurden die Ratten getötet und 10 - 20 ml Ascitesflüssigkeit mit einer Spritze abgesaugt. Nach einer Zentrifugation über 10 min bei 2000 x g wurden der zellfreie Überstand mit 0,02 % Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) versetzt und bei 4°C aufbewahrt. Das dabei gewonnene Zellpellet wurde in DMEM suspendiert, die Zellen in Nunc<sup>R</sup>- Kulturgefäße überführt und im offenen System kultiviert.

## 9. Produktion von serumfreiem Hybridomüberstand

Um serumfreien Hybridomüberstand gewinnen zu können, wurden die Hybridomzellen erst einmal in einer größeren Anzahl von Linbroplattenvertiefungen vermehrt und mit serumhaltigem DMEM gefüttert. Sobald die Zellen einen subkonfluenten Zustand erreicht hatten, wurde das serumhaltige Medium durch Absaugen vollständig entfernt und durch serumfreies DMEM ersetzt. Frühestens nach drei Tagen wurden die Überstände gesammelt, 10 min bei  $2000 \times g$  zentrifugiert, mit 0,02 %igem  $\text{NaN}_3$  versetzt und bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

## 10. Immunglobulinanreicherung durch Ammoniumsulfatpräzipitation

Zur Herstellung einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung wurden 1000 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in 1000 ml Aqua dest. gegeben, acht Stunden bei Raumtemperatur gerührt und über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  stehen gelassen. Mit 30 %iger NaOH wurde der pH auf 7,0-7,1 eingestellt (Fey et al.; 1976; Jonak, 1980;) Gleiche Volumina der serumfreien Überstände und der gesättigten Ammoniumsulfatlösung wurden miteinander gemischt und eine Stunde in ein Eisbad gestellt. Anschließend wurde 30 min bei  $48.000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  ultrazentrifugiert und das Präzipitat in einer der Einengung entsprechenden Menge PBS-A aufgenommen. Diese Lösung wurde in einen Dialyseschlauch gefüllt und solange gegen einen 0,2 M Barbitallpuffer (pH 7,2-7,4) dialysiert, bis darin keine  $\text{SO}_4^{2-}$ -Ionen mehr durch Bariumchlorid ( $\text{BaCl}_2$ ) nachgewiesen werden konnten. Für den  $\text{BaCl}_2$ -Nachweis wurden 5 ml Außendialysat mit 2 N HCl angesäuert und mit 3 Tropfen 10 %iger  $\text{BaCl}_2$ -Lösung versetzt. Das schwerlösliche  $\text{BaSO}_4$  fiel als weißer Niederschlag aus.

## 11. Agargel-Immunodiffusionstest

Die Bestimmung der Immunglobulinklassen der monoklonalen Antikörper erfolgte mit Hilfe der Immunodiffusion nach Ouchterlony (1962). Dabei wurde das mittlere Loch einer Immunodiffusionsplatte (Miles Lab. USA) mit Ziegen-anti-Ratte IgG (Cappel Lab. Cochranville, PA) bzw. Kaninchen-anti-Ratte IgM (Nordic, Immunol. Lab. Tilburg, Niederlande) beschickt. In jede zweite der randständigen Vertiefungen wurden jeweils 20  $\mu$ l der serumfreien, mittels Ammoniumsulfatpräzipitation auf das 10fache konzentrierten Hybridomüberstände pipettiert. Die dazwischen liegenden Löcher erhielten als Füllung PBS-A. Alle Vertiefungen wurden drei- bis viermal nachgefüllt. Die Inkubation der Platten erfolgte in einer feuchten Kammer. 24 bis 48 Stunden später konnten die Präzipitationslinien deutlich gesehen werden.

## 12. Quantitative Absorptionen

Für die quantitativen Absorptionsversuche wurden jeweils 100  $\mu$ l eines frischen oder mit Natriumazid konservierten Hybridomüberstandes mit  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  und  $1 \times 10^7$  Gliomzellen versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (Bechtol, 1980). In dieser Zeit wurde die Zellsuspension mehrmals resuspendiert. Nach der darauffolgenden Inkubation von 15 Stunden bei 4°C wurden die Zellen 10 min bei 2000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und auf noch vorhandene Antikörper untersucht.

## II. Ergebnisse

### 1. Fusionen

Insgesamt wurden 21 Fusionen mit Rattenmyelomzellen der Linie Y<sub>3</sub>Ag1.2.3 und Milzzellen von immunisierten Fi x Lou-Ratten durchgeführt.

Lediglich in einem Drittel der 21 Fusionen konnte Hybridomwachstum nachgewiesen werden. Zudem gab es in der Ausbeute der Hybridome Schwankungen von 1,1 % bis 92 %.

Die näheren Angaben müssen sich auf die Ergebnisse zweier Fusionen, nämlich Fusion 22 und 25 beschränken, weil die Hybridome der fünf anderen erfolgreichen Fusionen entweder keine Antikörper produzierten (Fus. 13 und 21), nach drei Wochen abgestorben waren (Fus. 17), Immunglobuline produzierten, aber unspezifisch waren (Fus. 19) oder aber im Verlauf der Klonierung die Antikörperproduktion einstellten (Fus. 20), (Tab. 3).

Da die Hybridomzellen als "monolayer"-Kulturen wuchsen und keine Kolonien bildeten, kann lediglich eine Aussage über die Mindest-Fusionsrate getroffen werden, und zwar beträgt sie bei  $10^7$  Myelomzellen und  $10^8$  Milzzellen und einem Ergebnis von 66 mit Hybridomzellen bewachsenen Linbrolöchern (Fus. 25)  $6,6 \times 10^{-6}$ . Es ist aber doch wahrscheinlicher, daß sich in den Plattenvertiefungen mehrere unterschiedliche Y<sub>3</sub>Ag1.2.3 x Splenocyt-Hybridzellen befanden, da sich die Verteilung der Hybridomzellen über das gesamte Loch erstreckte. Die Hybridzellen waren rundlich - oval bis birnenförmig, häufig sogar mit fingerförmigen Protrusionen versehen und zeigten eine hohe Teilungsrate (Abb. 2).

Die Isolierung einzelner Zellkolonien erwies sich als nicht möglich, so daß die Gesamtzahl der Zellen eines Linbroloches der Klonierung unterzogen wurde.

Drei bis vier Tage nach der Fusion konnten die ersten Hybridzellen gesehen werden, während die Myelomzellen in der HAT-Kontrollreihe in dieser Zeit - spätestens

Tabelle 3

Protokoll der Fusionen 22 und 25

|                     |                                |                                        | Verhältnis<br>Milz/Myelomzellen |
|---------------------|--------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------|
| Myelomzelllinie     | Y <sub>3</sub> Ag1.2.3         | 1 x 10 <sup>7</sup>                    | 10 : 1                          |
| Fi x Lou-Ratten (q) | Milzzellen                     | 1 x 10 <sup>8</sup>                    |                                 |
| Antigen             | 78-FR-G-344                    |                                        |                                 |
| Immunisierung       | Grundimmun.                    | 1 x 10 <sup>6</sup> native Zellen i.p. |                                 |
|                     | Boosterung                     | 5 x 10 <sup>6</sup> native Zellen i.p. |                                 |
| Tag der Fusion      | 3. bzw. 4. Tag nach Boosterung | nach 11 Wochen                         |                                 |
| Fusionsvermittler   | PEG, MG 4000, 50 %ig           |                                        |                                 |
| Arbeitstemperatur   | Raumtemperatur                 |                                        |                                 |
| PEG-Einwirkung      | 1,5 min bei 37°C im Wasserbad  |                                        |                                 |
| "Feeder-layer"      | Mäuseperitonealzellen          |                                        |                                 |

aber nach sechs Tagen - abgestorben waren. Nach etwa zwei Wochen waren die Hybridomzellen dicht gewachsen und der Kulturüberstand wurde mit Hilfe einer IP-Färbung mit 78FR-G-344 als Targetzellen auf den Gehalt an Antikörpern getestet.

Die Ergebnisse dieses Tests sind in der Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4

Übersicht über entstandene und antikörperproduzierende Hybridome aus den Fusionen 22 und 25

|         | Plattenvertiefungen mit Hybridomwachstum | Plattenvertiefungen mit antikörperproduzierenden Hybridomen | Anzahl der klonierten Hybridome |
|---------|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| Fus. 22 | 7/ 90 (7,8%)                             | 6/ 7 (86%)                                                  | 6                               |
| Fus 25  | 66/ 72 ( 92%)                            | 52/ 66 (79%)                                                | 21                              |
| total   | 73/162 ( 45%)                            | 58/ 73 (79%)                                                | 27                              |

## 2. Klonierung der antikörperproduzierenden Hybridome

Die gesamte Zellpopulation eines Antikörper-positiven Linbroloches wurde einem dreimaligen Klonierungsverfahren nach der Endpunktverdünnungsmethode unterworfen.

Von Fusion 22 wurden sechs primäre Hybridomkulturen kloniert. Die Zellen der Stammkultur 22H verloren ihre Fähigkeit zur Antikörperbildung schon während der ersten Klonierungsstufe, d.h. etwa drei Wochen nach der Fusion. Bei der Hybridomkultur 22K verringerte sich nicht nur die Ausbeute an positiven Kolonien in den Mikrolöchern von Stufe zu Stufe, sondern auch die Immunglobulinproduktion wurde schwächer. Bei den vier übrigen Hybridomkulturen steigerte sich der Prozentsatz von antikörperpositiven Kolonien auf 100 % in der letzten Klonierungsstufe (Tab. 5).

Tabelle 5

Detaillierte Angaben zur Klonierungsausbeute der  
Fusion 22, dargestellt als Quotient

Anzahl der positiven Kulturüberstände  
Anzahl der getesteten Kulturüberstände

| Ursprungs-<br>hybridome<br>(Linbrolöcher) | <u>Klonierungsstufen</u> |               |               |
|-------------------------------------------|--------------------------|---------------|---------------|
|                                           | 1                        | 2             | 3             |
| B                                         | 48/48 (100 %)            | 46/48 ( 96 %) | 48/48 (100 %) |
| H                                         | 15/48 ( 31 %)            | 0/24 --       | - - --        |
| J                                         | 48/48 (100 %)            | 48/48 (100 %) | 48/48 (100 %) |
| K                                         | 15/48 ( 31 %)            | 3/48 (6,3 %)  | 3/12 ( 24 %)  |
| M                                         | 48/48 (100 %)            | 48/48 (100 %) | 48/48 (100 %) |
| N                                         | 48/48 (100 %)            | 48/48 (100 %) | 48/48 (100 %) |

Anschließend an die dritte Klonierung wurden die Klone durch eine IP-Färbung mit Hirn- und Nierenzellen von Ratten und 78FR-G-344-Zellen getestet, um die Klone zu selektieren, deren Antikörper keine Bindung mit normalem Rattengewebe eingingen. Dabei zeigte es sich, daß die Klone zweier Ursprungshybridome - 22I und 22M - monoklonale Antikörper produzierten, die ausschließlich mit Gliomzellen reagierten. Von diesen Klonen wurden jeweils drei C1 - C3 permanent kultiviert, die übrigen eingefroren.

Da die 25. Fusion 52 Antikörper-produzierende Hybridome erbrachte, wurde aus arbeitstechnischen Gründen die Selektion der spezifisch mit Gliomzellen reagierenden Hybridome vor der Klonierung durchgeführt. Als Ergebnis fanden sich 21 Hybridome, deren Antikörper eine gezielte Bindung mit 78FR-G-344 eingingen, dagegen nicht mit Hirn- und Nierenzellen von Ratten reagierten. 26 Hybridomüberstände zeigten unterschiedlich starke Reaktionen mit Rattengewebe, sie wurden eingefroren. Die restlichen fünf Hybridome entwickelten sich schlecht und starben nach kurzer Zeit ab.

Von den 21 klonierten primären Hybridomkulturen behielten lediglich 14 eine stabile Antikörperproduktion während der gesamten Klonierungsprozedur bei. Vier Hybridome stellten die Immunglobulinproduktion ein und bei drei Hybridomen verringerte sich die Anzahl der positiv reagierenden Kulturüberstände, gemessen an der Zahl der getesteten, von Stufe zu Stufe. Sie wurden nicht weiter kultiviert, da darauf geachtet wurde, nur stabile antikörperproduzierende Klone zu etablieren. Die Klonierungsergebnisse der Fusion 25 sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6

Darstellung der Klonierungsergebnisse der spezifisch  
mit der Gliomzelllinie 78FR-G-344 reagierenden Hybridom-  
produkte aus Fusion 25, dargestellt als Quotient

Anzahl der positiven Kulturüberstände  
Anzahl der getesteten Kulturüberstände

| Ursprungshybridome<br>(Linbrolöcher) | <u>Klonierungsstufen</u> |       |       |
|--------------------------------------|--------------------------|-------|-------|
|                                      | 1                        | 2     | 3     |
| A                                    | 20/24                    | 21/24 | 0/21  |
| B+                                   | 24/24                    | 6/12  | 20/20 |
| C                                    | 18/24                    | 24/24 | 9/22  |
| D+                                   | 24/24                    | 17/17 | 20/20 |
| E+                                   | 24/24                    | 24/24 | 24/24 |
| F                                    | 0/6                      | -     | -     |
| G+                                   | 24/24                    | 24/24 | 24/24 |
| H                                    | 20/24                    | 14/24 | 3/24  |
| J+                                   | 17/18                    | 22/24 | 24/24 |
| K+                                   | 14/24                    | 17/18 | 20/24 |
| L+                                   | 20/24                    | 24/24 | 24/24 |
| M+                                   | 24/24                    | 20/24 | 24/24 |
| N+                                   | 24/24                    | 18/20 | 22/22 |
| O                                    | 6/24                     | 0/24  | -     |
| P                                    | 0/18                     | -     | -     |
| R+                                   | 19/24                    | 24/24 | 24/24 |
| S+                                   | 12/12                    | 12/12 | 20/20 |
| T+                                   | 23/24                    | 24/24 | 24/24 |
| U+                                   | 22/22                    | 14/24 | 20/21 |
| V                                    | 24/24                    | 24/24 | 9/18  |
| W+                                   | 12/12                    | 24/24 | 20/20 |

+ Von diesen Hybridomen wurden jeweils drei Klone etabliert.

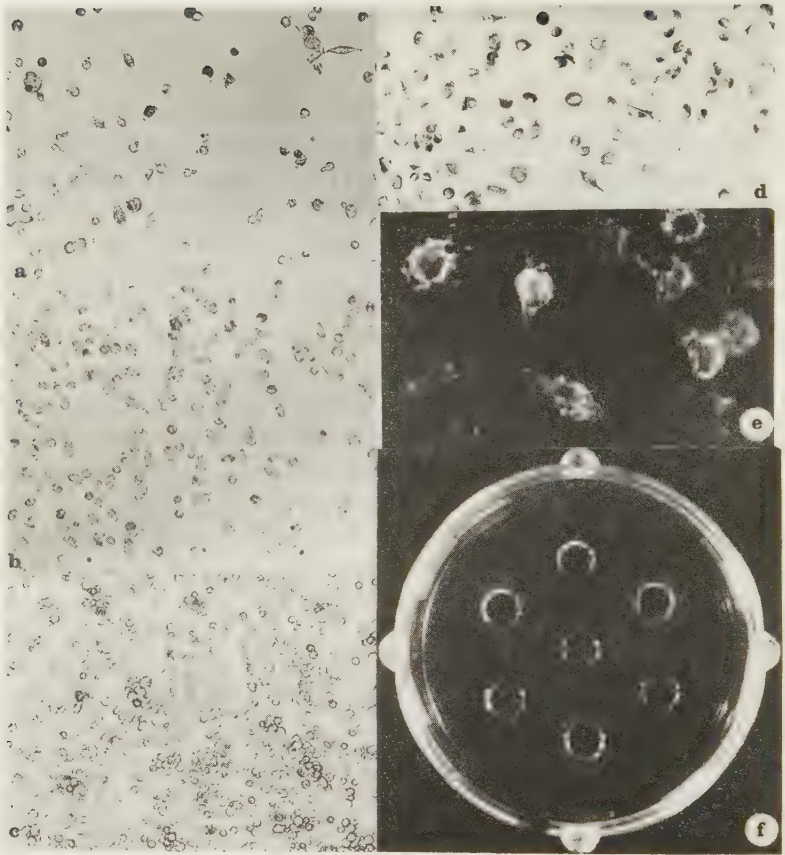


Abb. 2: Hybridzellkulturen am 5. Tag (a), 10. Tag (b) und 15. Tag (c) nach der Fusion.

- (d) Indirekte Immunperoxidasefärbung: Auf einzelne Stellen der Zelloberfläche begrenzte Reaktionen der monoklonalen Antikörper mit Zellen der Gliomlinie 78FR-G-344.
- (e) Immunofluoreszenztest: Spezifische Membranfluoreszenz an Zellen der Linie 78FR-G-344.
- (f) Immunodiffusionstest: Präzipitationslinien zwischen dem mit Anti-Ratten-IgG gefüllten mittleren Loch und den mit Klonkulturüberstand gefüllten Randvertiefungen.

(a, b, c, d: x 120; e: x 300; f: x 1,3)

### 3. Monoklonale Antikörper, die normale syngene Rattenzellen nicht erkannten

Die beiden Fusionen erbrachten insgesamt 48 Klone - etabliert aus 16 primären Hybridomkulturen - deren Antikörper gezielt mit den Zellen der zur Immunisierung verwendeten Gliomlinie 78FR-G-344 reagierten, normales syngenes Rattengewebe dagegen nicht erkannten.

Bei der Auswertung der indirekten Immunperoxidasefärbung unter dem Lichtmikroskop fiel auf, daß die monoklonalen Antikörper ausschließlich partielle Bindungen mit den Zelloberflächen bei unterschiedlicher Färbeintensität, von schwach positiv bis positiv, eingingen. Lediglich die sehr stark positiv reagierenden Antikörper der Klone 22JC3, 22MC3 und 25EC1, sowie Ascitesflüssigkeit, führten zu einer homogenen Rotfärbung der gesamten Zelle. Darüberhinaus fanden sich in jeder mit einem Antikörper reagierenden Zellpopulation einzelne Zellen, die im Gegensatz zu den umliegenden Zellen, nicht angefärbt waren. (Abb. 2) Diese Aussagen treffen auch auf die bei Kreuzreaktionsversuchen verwendeten Zellen zu. Die Kulturüberstände aller permanenten Klone wurden wiederholt getestet, um die Stabilität der Antikörperproduktion zu überprüfen. Denn einige Klone stellten, obwohl ihre Zellen ein gutes Wachstum zeigten, die Produktion von Immunglobulin im Laufe der Zeit ein. (Tab. 7)

Tabelle 7

Klone, die die Antikörperproduktion eingestellt haben

|       |                          |
|-------|--------------------------|
| 25BC1 | 6 Wochen nach der Fusion |
| 25DC2 | 4 Monate nach der Fusion |
| 25KC3 | 4 Monate nach der Fusion |
| 25LC2 | 4 Monate nach der Fusion |
| 25NC1 | 4 Monate nach der Fusion |
| 22MC3 | 6 Monate nach der Fusion |

Die Ergebnisse eines micro-ELISA's, in dem als Target-Zellen 78FR-G-344 sowie Hirn- und Nierenzellen verwendet wurden, sind in Tabelle 8 dargestellt. Es werden nur die Werte des Klons aufgeführt, der von den drei jeweils getesteten die deutlichsten Reaktionen aufweist.

Tabelle 8

Reaktivität verschiedener monoklonaler Antikörper mit  
der Gliomzelllinie 76FR-G-344 und normalen Rattenzellen  
(micro-ELISA)

| Klon-<br>produkt | 78FR-G-344 | Hirnzellen | Nierenzellen |
|------------------|------------|------------|--------------|
| 25DC1            | 226        | 11         | 23           |
| 25EC1            | >2000      | 21         | 20           |
| 25GC2            | 263        | 25         | 26           |
| 25JC3            | 363        | 16         | 20           |
| 25KC3            | 313        | 9          | 12           |
| 25LC2            | 260        | 10         | 23           |
| 25MC2            | 322        | 12         | 21           |
| 25NC2            | 281        | 23         | 37           |
| 25RC3            | 310        | 15         | 27           |
| 25SC3            | 420        | 12         | 33           |
| 25TC1            | 305        | 10         | 30           |
| 25UC2            | 375        | 14         | 34           |
| 25WC3            | 394        | 15         | 19           |
| 22IC3            | >2000      | 15         | 30           |
| 22MC3            | 534        | 14         | 28           |
| NKW              | 22         | 25         | 20           |
| PKW              | >2000      | 917        | 926          |

NKW: Negativkontrollwert

PKW: Positivkontrollwert

#### 4. Kreuzreaktionen der monoklonalen Antikörper mit weiteren chemisch induzierten Rattengliomen

Neben der zur Immunisierung von Fi x Lou-Ratten verwendeten Gliomlinie 78FR-G-344 kamen weitere Gliomzelllinien - deren Ursprungstumoren ebenfalls mittels Nitrosoharnstoff induziert worden waren - als Targetzellen zur Anwendung.

Die Reaktionen der Klonprodukte mit verschiedenen Gliomzelllinien konnte als weitgehend einheitlich bezeichnet werden. So reagierten 10 von 11 getesteten Klonprodukten positiv mit der Linie 78FR-G-284. Die Gliomzelllinie 79FR-G-41 wurde von 8 der 11 monoklonalen Antikörper erkannt. Dagegen gab es keine Bindungen mit den Zellen der Linien 78FR-G-219 und 78FR-G-299 (Tab. 9).

#### 5. Kreuzreaktionen selektierter monoklonaler Antikörper mit chemisch induzierten Kaninchengliomzelllinien

Die Kulturüberstände von 10 Klonen wurden auf ihr Bindungsverhalten zu fünf durch Nitrosoharnstoff erzeugten Kaninchengliomzelllinien geprüft.

Die monoklonalen Antikörper der beiden Klone 22IC3 und 25EC1, die mit drei der fünf getesteten Rattengliomzelllinien stark positiv reagierten, zeigten ebenfalls deutliche Kreuzreaktionen mit den fünf Kaninchengliomzelllinien. Zwei andere Klonantikörper erkannten jeweils zwei unterschiedliche Tumorklinien, während die Antikörper der restlichen Klone keine Bindungen mit den Kaninchentumorzellen eingingen. (Tab. 10)

Die Ergebnisse der Klone, deren Kulturüberstände nicht mit Hirn- und Nierenzellen reagierten, dagegen Kreuzreaktionen mit allen anderen getesteten Gliomen aufwiesen, wurden in gewichteter Form in Tabelle 11 zusammengefaßt.

Tabelle 9

Kreuzreaktivität selektierter monoklonaler Antikörper mit weiteren chemisch induzierten Rattenglomen (micro-ELISA)

| Klonprodukt | 78FR-G-344 | 79FR-G-41 | 79-FR-G-219 | 78FR-G-284 | 78FR-G-299 |
|-------------|------------|-----------|-------------|------------|------------|
| 25EC1       | 2000       | 242       | 29          | 773        | 58         |
| 25GC2       | 263        | 45        | 25          | 56         | 30         |
| 25JC3       | 363        | 88        | 32          | 181        | 45         |
| 25MC2       | 322        | 28        | 26          | 123        | 45         |
| 25RC3       | 310        | 82        | 28          | 78         | 56         |
| 25SC3       | 420        | 148       | 38          | 139        | 60         |
| 25TC1       | 305        | 74        | 27          | 28         | 32         |
| 25UC2       | 375        | 120       | 21          | 66         | 31         |
| 25WC3       | 394        | 41        | 22          | 103        | 40         |
| 22JC3       | 2000       | 308       | 27          | 372        | 42         |
| 25MC4       | 534        | 112       | 31          | 304        | 22         |
| NKW         | 30         | 30        | 27          | 27         | 32         |
| PKW         | 2000       | 1021      | 964         | 892        | 942        |

Tabelle 10

Kreuzreaktionen selektierter monoklonaler Antikörper mit Gliomlinien aus experimentellen Hirntumoren des Kaninchens (micro-ELISA)

| Klon-<br>produkt | 78FR-G-344 | 77RB-G-34 | 77RB-G-58 | 77RB-G-359 | 76RB-G-381 | 776RG-G 414H |
|------------------|------------|-----------|-----------|------------|------------|--------------|
| 25EC1            | 2000       | 325       | 189       | 380        | 120        | 86           |
| 25SC3            | 420        | -         | 96        | -          | 72         | -            |
| 25WC3            | 394        | 101       | 112       | -          | -          | -            |
| 22IC3            | 2000       | 221       | 210       | 105        | 97         | 118          |
| NKW              | 30         | 31        | 31        | 29         | 30         | 41           |
| PKW              | 2000       | 818       | 890       | 935        | 928        | 1012         |

Zusammenfassung der Klone, die mit den getesteten Gliomzelllinien reagierten

| Klon-<br>produkt | Rattengliomzellen |               |                |                |                |               | Targetzellen  |                                                                                       |                             |
|------------------|-------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
|                  | 78FR-<br>G-344    | 79FR-<br>G-41 | 78FR-<br>G-219 | 78FR-<br>G-284 | 78FR-<br>G-299 | 77RB-<br>G-34 | 77RB-<br>G-58 | Kaninchengliomzellen<br>77RB- 77RB- 77RB- 76RB- 76RB-<br>G-34 G-58 G-359 G-381 G-414H | Rattenzellen<br>Hirn Nieren |
| 25EC1            | ++                | ++            | -              | ++             | -              | ++            | ++            | ++                                                                                    | -                           |
| 25SC3            | ++                | ++            | -              | ++             | -              | -             | +             | +                                                                                     | -                           |
| 25WC3            | ++                | -             | -              | +              | -              | +             | -             | -                                                                                     | -                           |
| 22IC3            | ++                | ++            | -              | ++             | -              | ++            | +             | +                                                                                     | -                           |
| 22MC3            | ++                | +             | -              | ++             | -              | n.g.          | n.g.          | n.g.                                                                                  | -                           |
| n.g.             | nicht getestet    |               |                |                |                |               |               |                                                                                       |                             |
| ++               | stark positiv     |               |                |                |                |               |               |                                                                                       |                             |
| +                | positiv           |               |                |                |                |               |               |                                                                                       |                             |
| -                | negativ           |               |                |                |                |               |               |                                                                                       |                             |

## 6. Immunodiffusion

Da sich die Präzipitationslinien im Agargel-Immunodiffusionstest gegen das Ziegen-anti-Ratten IgG ausbildeten, kann angenommen werden, daß es sich bei den Immunglobulinen der getesteten Kulturüberstände der Klone 22IC3, 22MC3 und 25EC1 um IgG handelt (Abb. 2).

## 7. Immunofluoreszenz-Test

Als Ergebnis des Immunofluoreszenz-Tests zeigte sich bei 15 - 20 % der Zellen der Linie 78FR-G-344 eine spezifische Membranfluoreszenz. Die fluoreszierenden Reaktionsprodukte lagen als diffuse flächen- oder punktförmige Ansammlungen eines granulären gelblichen Materials in unregelmäßiger Verteilung an den Membranen der Zellkörper und der Fortsätze (Abb. 2).

## 8. Quantitative Absorption

Die zur Immunisierung verwendete Gliomzelllinie 78FR-G-344 und die kreuzreagierende Linie 78FR-G-284 wurden zu Absorptionsversuchen herangezogen.

Durch die erzielten Ergebnisse konnte gezeigt werden, daß der Antikörpergehalt der Überstände mit steigenden zur Absorption verwendeten Zellzahlen abnahm und bei einer Inkubation von 100  $\mu$ l Kulturüberstand mit  $10^7$  Gliomzellen unter die Nachweisgrenze gesunken war. Absorptionsversuche mit Rattenhirnzellen führten dagegen nicht zu einer Reduzierung der Antikörper in den Hybridomüberständen (Abb. 3).

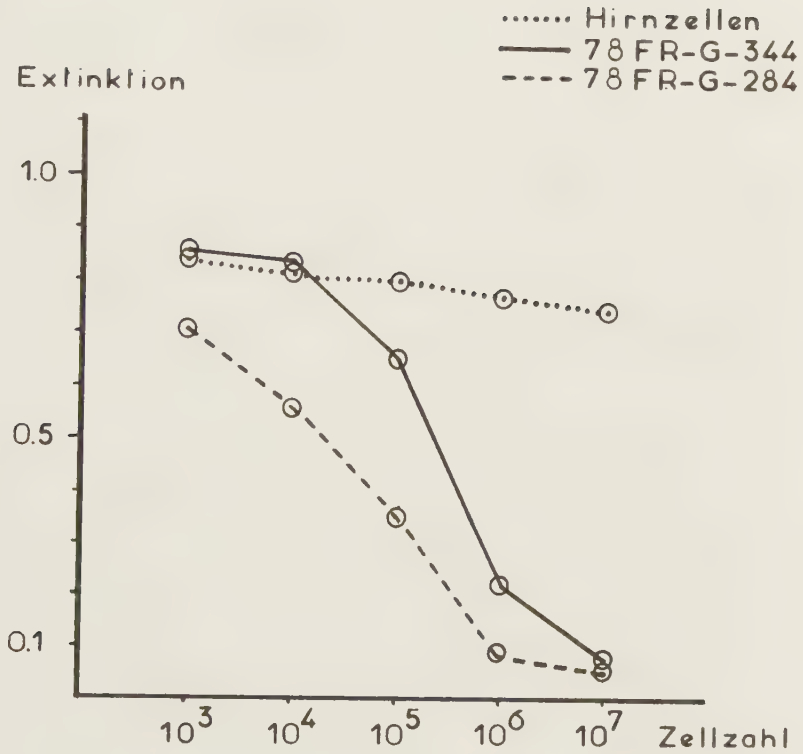


Abb. 3: Absorption von monoklonalen Antikörpern aus dem Kulturüberstand des Klon 25EC<sub>1</sub> mit den Zellen chemisch induzierter Rattengliome (78FR-G-344, 78FR-G-284) und normalen Rattenhirnzellen (micro-ELISA).

## 9. Intraperitoneale Transplantation von Hybridomen

Um Antikörperkonzentrationen zu erhalten, die um ein 100- bis 1000faches höher lagen als in den Zellkulturüberständen, wurden gesunde, makrophagenfrei wachsende Zellen der Klone 22IC3, 22MC3 und 25EC1 in unterschiedlichen Konzentrationen (von  $0,5-1 \times 10^6$  Zellen) 12 Lou-Ratten intraperitoneal appliziert.

Die eine Hälfte der Tiere war 3-6 Wochen vorher mit je 1ml Prestane<sup>R</sup> behandelt worden.

Bei allen 12 Tieren bildete sich, selbst nach der Verabreichung kleiner Zellzahlen ( $5 \times 10^5$ ) auch ohne Prestane<sup>R</sup>-Vorbehandlung, nach ca. 8-10 Tagen Ascites. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Tiere deutliche Störung des Allgemeinbefindens. Sie wurden getötet und 10 - 25 ml einer blutigen, stark zellhaltigen Flüssigkeit wurde gewonnen.

Nach Zentrifugation und Lysis der Erythrozyten mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  konnte durch Zählung ein durchschnittlicher Hybridomzellgehalt von  $1,6 \times 10^8$  Zellen/ml ermittelt werden.

Diese Hybridomzellen zeigten im HAT-Medium, auch ohne "feeder-layer" gutes Wachstum und ihr Kulturüberstand reagierte in allen Tests ebenso wie der der Ursprungsklone. Neben dem Ascites kam es bei allen Tieren zur Ausbildung solider Tumoren von Stecknadelkopf- bis Walnußgröße, die in verschiedenen Bauchorganen lokalisiert waren.

Von den Ascitesproben der intraperitoneal gezüchteten Hybridome 22JC3, 22MC3 und 25EC1 wurden Verdünnungsreihen angelegt und durch die IP-Färbung und den micro-ELISA ein Titer von 1:100 000 festgestellt. Der Immunglobulin-gehalt dieser in vivo gewonnenen Flüssigkeiten liegt also 100fach über dem Antikörpergehalt der Hybridomüberstände.

#### D. Diskussion

Die beiden in dieser Arbeit beschriebenen Fusionen zwischen Fi x Lou-Rattenmilzzellen und der Rattenmyelomzelllinie Y<sub>3</sub>Ag1.2.3 erbrachten 73 Hybridomkulturen. Davon produzierten 58 Kulturen (=79 %) Antikörper gegen das Immunogen.

Diese Ergebnisse können, verglichen mit denen anderer Autoren, die auch mit der Rattenmyelomlinie Y<sub>3</sub>Ag1.2.3 arbeiteten, als zufriedenstellend bezeichnet werden. So erzielten Galfré et al. (1979) gegen Mäuse IgG 16 %, Hashimoto et al.; (1981) gegen Blasentumorzellen 3 %, North et al.; (1982) gegen Fibrosarkomzellen 6 % bzw. 11 % und Dean et al.; (1982) gegen allogene Zellen 1 % antikörperproduzierende Hybridome. Untersuchungen, bei denen Mäusemyelomzellen verwendet wurden, brachten mit der hier vorliegenden Arbeit besser vergleichbare Ergebnisse.

Stavrou et al.; (1983) erhielten gegen Gliomzellen 44 % antikörperproduzierende Hybridome und Koprowski et al. (1978) erzielten mit Tollwutvirus als Antigen sogar eine Ausbeute von 75 % sezernierender Hybridome.

Für die große Zahl erfolgloser Fusionen der vorliegenden Arbeit kommt als Ursache das Wachstumsverhalten der Myelomzellen Y<sub>3</sub>Ag1.2.3 zu Beginn der Fusionsversuche in Betracht. Nachdem die Zellen zur erneuten Kultivierung aufgetaut worden waren, wuchsen sie ausschließlich als "monolayer". Erst nach etwa fünf Monaten begannen die Zellen ihr adhäsives Wachstum aufzugeben und in Suspension zu wachsen. Dies war eine Grundvoraussetzung für das Gelingen einer Fusion, da nur gesunde, in Medium schwimmende Myelomzellen Verwendung finden sollen (Galfré et al., 1979; North et al.; 1982; Dean et al.; 1982). Von dem

Zeitpunkt an, als die Fusionen mit in Suspension wachsenden Y<sub>3</sub>Ag1.2.3 Zellen durchgeführt wurden, waren Erfolge in der Hybridomproduktion zu verzeichnen.

Über den Einfluß der unterschiedlichen Immunisierungen auf die Hybridomausbeute können aus oben genannten Gründen keine Aussagen gemacht werden. Bei den erfolgreichen Fusionen differierten Zellzahlen und Applikationsweisen nur geringfügig.

Allgemein kann jedoch festgestellt werden, daß bei der Grundimmunisierung geringe Antigenmengen eingesetzt werden sollten, zum einen um eine Immunparalyse zu vermeiden, zum anderen um die Bildung von humoralen Antikörpern möglichst niedrig zu halten. Hohe Antikörperkonzentrationen können durch Neutralisation erneut applizierter Antigengaben die Stimulierung von in der Milz lokalisierten "Precursor"-B-Lymphozyten, die wahrscheinlich die bevorzugten Fusionspartner darstellen, verhindern. So erbrachten Fusionen, die mit nicht-aktivierten B-Zellen durchgeführt wurden, keine Hybridome (Andersson u. Melchers, 1978).

Es wurde darauf geachtet, daß die Reimmunisierung frühestens nach zwei Monaten und außerdem intraperitoneal erfolgte. Die Ruhezeit zwischen den Antigengaben war wichtig, um zu vermeiden, daß eine erneute Reaktion des Immunsystems durch noch vorhandene humorale Antikörper gestört wurde. Die intraperitoneale Applikation des Antigens erwies sich als vorteilhaft gegenüber der intravenösen Injektion, da hierbei durch die sofortige Neutralisation der Antigene die Milzzellen nicht mehr in genügendem Maße stimuliert werden können (Lostrum et al., 1979; Buchmeier et al., 1980). Als geeigneter Zeitpunkt für die Fusion gilt der dritte oder vierte Tag nach der letzten Immunisierung, da zu diesem Zeitpunkt die Proliferation Antigen-aktivierter B-Zellen am stärksten ist. Dagegen führten Fusionen,

die am siebten oder achten Tag nach der Boosterung am Tag des höchsten Antikörpertiters vorgenommen wurden, zu keinem Ergebnis (Oi et al., 1978).

Zur Durchführung der Fusion selbst ist zu sagen, daß es von großer Wichtigkeit war, die Zellen in jeder Phase des Arbeitsablaufes vorsichtig und schonend zu behandeln. Dazu gehörten das Abrütteln der Myelomzellen vom Kulturgefäß ebenso wie das Lösen des Zellpellets nach der PEG-Zugabe durch leichtes Klopfen des Zentrifugenröhrchens, das vorsichtige Schütteln der PEG-Zellsuspension im 37°C warmen Wasserbad (Galfré et al. 1977) und das schonende Zentrifugieren nach der PEG-Einwirkung. Auf die große Instabilität der Hybridome wird von vielen Autoren hingewiesen (Köhler et al., 1976; Yelton et al., 1978; Hengartner et al., 1978; Galfré et al., 1980). Das Unvermögen einiger Hybridome, die leichten und schweren Immunglobulinketten über einen längeren Zeitraum zu synthetisieren, wird Chromosomenverlusten zugeschrieben, denn der Verlust der Antikörperproduktion ist irreversibel (Köhler, 1980). Ein weiterer Grund für die Instabilität der Hybridomkulturen ist das Überwuchern der produzierenden Hybridomzellen mit nicht-produzierenden Varianten (Gerhard et al., 1978). Um die Antikörper-produzierenden Hybridome stabil zu halten, wurden sie möglichst schnell einer dreimaligen Klonierung unterzogen. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Ausbeute an Antikörper-positiven Hybridomen am Ende der einzelnen Klonierungsstufen annähernd 100 % betrug. Trotzdem stellten neun von insgesamt 28 klonierten Hybridomen ( $\approx 32$  %) ihre Immunglobulinproduktion im Laufe der Klonierung ein. Von den 48 in Langzeitkultur gehaltenen Klonen verloren

sechs ( $\approx 12,5$  %) nach etwa eineinhalb bis sechs Monaten die Fähigkeit zur Antikörperproduktion, wobei die Zellen gesund waren und gut wuchsen.

Verglichen mit Goding (1980), der einen Verlust aller ursprünglich antikörperproduzierenden Hybridome von 50 - 70 % erwartet, kann die Stabilität dieser Intraspezies-Hybridome als recht gut bezeichnet werden.

Die drei in der vorliegenden Arbeit näher untersuchten Klone 22IC3, 22MC3 und 25EC1 produzierten Immunglobuline der Klasse IgG. Auch Cuello (1982) erhielt durch Fusion von hyperimmunisierten Rattenmilzzellen mit  $Y_3Ag1.2.3$  - Zellen Hybridome, die komplettes Ratten-IgG und zudem noch die leichte kappa-Kette, die ja ein Charakteristikum der Myelomzelllinie  $Y_3Ag1.2.3$  darstellt, produzierten. Gerhard et al. (1980) und auch Dean et al. (1982) beschrieben, daß die Entstehung der Ig-Klassen von der Herkunft der Lymphozyten abhängig ist. So sezernieren Hybridome, die aus einer Fusion von Myelomzellen mit Milzlymphozyten entstanden sind, zu 73 % IgG, zu 27 % IgM, aber kein IgA. Hybridome dagegen aus Fusionen, bei denen Myelomzellen und Lymphknotenlymphozyten verwendet wurden, produzierten zu 7,4 % IgA, zu 3,7 % IgM und zu 89 % IgG.

Die beiden hier beschriebenen Fusionen erbrachten 58 Hybridome, deren Antikörper mit den Antigenen der zur Immunisierung verwendeten Zelllinie 78FR-G-344 Bindungen eingingen. Davon besaßen jedoch nur 16 Hybridomkulturen und die daraus gewonnenen 48 Klone eine spezifische Bindungsaffinität; d.h. sie reagierten ausschließlich mit Antigenen bzw. Antigendeterminanten, die von den Gliomzellen exprimiert wurden.

Die partielle Anfärbbarkeit der Targetzellen bei der indirekten Immunperoxidasefärbung (IPF) läßt den Schluß zu,

daß die von den entsprechenden monoklonalen Antikörpern erkannten Antigene auf der Zellmembran in unterschiedlicher Anordnung lokalisiert sein dürften.

Bei dem zytochemischen Nachweis von Zelloberflächenstrukturen, die eine Bindung mit monoklonalen Antikörpern eingingen, konnten variierende Zellzahlen festgestellt werden, die keine positive Reaktion zeigten. Über ähnliche Ergebnisse berichten Hashimoto et al. (1981), Yeh et al. (1981) und Stavrou et al. (1982). Als Erklärung hierfür kommen zum einen eine genetisch determinierte Heterogenität, zum anderen eine vom Zellzyklus abhängige Antigenexpression in Betracht.

Die Überprüfung von 11 monoklonalen Antikörpern, die gegen die Gliomlinie 78FR-G-344 gerichtet waren, auf Kreuzreaktionen mit vier weiteren chemisch induzierten Rattengliomen ergab unterschiedliche Erkennungsmuster. Die Linie 78FR-G-284 wurde von 10 Antikörpern erkannt und mit der Gliomlinie 79FR-G-41 reagierten acht Antikörper; dagegen kam es bei den Linien 78FR-G-219 und 78FR-G-299 zu keiner positiven Bindung.

Das Bindungsverhalten der monoklonalen Antikörper wurde außerdem mit experimentell erzeugten Kaninchengliomen getestet. Dabei zeigten lediglich die Antikörper der Klone 22IC3 und 25EC1 deutliche Kreuzreaktionen mit allen fünf Kaninchengliomzellen. Zwei andere Klonprodukte erkannten jeweils zwei unterschiedliche Tumorlinien.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß zumindest einige der durch Nitrosoharnstoff induzierten Gliome bei beiden Spezies gleiche oder ähnliche Antigene exprimieren. Inwieweit ein monoklonaler Antikörper ein Antigen oder mehrere unterschiedliche Antigendeterminanten an den verschiedenen Tumorzelllinien erkennt, kann

aufgrund der vorliegenden Befunde nicht festgestellt werden. Durch quantitative Absorptionsversuche konnte die Bindungsspezifität der monoklonalen Antikörper der Klone 22IC3 und 25EC1 an die Antigene der Gliomzelllinie 78FR-G-344 nachgewiesen werden. Die Konzentration der Antikörper in den Hybridomkulturüberständen wurde von den Zellen der getesteten Gliomlinien graduell verringert. Die verbliebene Antikörperaktivität in den Hybridomüberständen stand in reziproker Korrelation zu den bei der Absorption verwendeten ansteigenden Gliomzellzahlen.

Über die Natur der hier mit Hilfe monoklonaler Antikörper nachgewiesenen gliomassoziierten Antigene - inwieweit es sich um Differenzierungsantigene (Wikstrand et al.; 1982), um Neoantigene (Sikora et al.; 1982) oder um solche Antigene handelt, die allen Geweben gemeinsamen embryonalen Ursprungs angehören (Schnegg et al.; 1981) - kann keine Aussage getroffen werden.

Im Hinblick darauf, daß die hier gewonnenen Hybridome in hohem Maße monoklonale Antikörper produzieren und die produzierenden Hybridome eine große Stabilität besitzen, kann festgestellt werden, daß diese Intraspezies-Hybridome geeignet sind, weitere Untersuchungen zur Natur von gliomassoziierten Antigenen zu ermöglichen.

## E. Zusammenfassung

Durch Fusion von Rattenmyelomzellen der Linie Y<sub>3</sub>Ag1.2.3 und gegen 78FR-G-344 sensibilisierte Rattenmilzzellen wurden antikörperproduzierende Hybridome hergestellt. Die beiden ausgewerteten Fusionen erbrachten 73 Hybridomkulturen, von denen 58 Antikörper produzierten. Nach dem Klonieren konnten 48 Hybridomklone kultiviert werden, deren Antikörper selektiv Bindungen mit den zur Immunisierung verwendeten Gliomzellen eingingen. Kreuzreaktionen konnten mit zwei der vier getesteten Rattengliomlinien und mit allen fünf Kaninchengliomlinien nachgewiesen werden, wobei unterschiedliche Erkennungsmuster vorlagen. Durch Absorptionen von Kulturüberständen der Klone 22IC3 und 25EC1 mit Zellen der zur Immunisierung verwendeten Gliomlinie konnte gezeigt werden, daß der Antikörpergehalt der Überstände graduell mit steigenden zur Absorption verwendeten Zellzahlen abnahm und bei einer Inkubation von 100 µl Kulturüberstand mit 10<sup>7</sup> Gliomzellen unter die Nachweisgrenze gesunken war.

Die Antikörper der drei geprüften Klone gehörten zur Immunglobulinklasse G.

Ausgewählte Hybridome wurden in die Bauchhöhle von Ratten, die teilweise mit Prestane<sup>R</sup> vorbehandelt waren, transplantiert. Der Antikörpergehalt der nach acht Tagen gewonnenen Ascitesflüssigkeit und des Serums lag im Vergleich zu den Kulturüberständen wesentlich höher.

Aufgrund ihrer Eigenschaften stellen diese Intraspezies-Hybridome eine Grundlage für weitere Untersuchungen bezüglich der Antigennatur von Gliomen dar.

---

Die Untersuchungen wurden mit finanzieller Unterstützung durch die W. Sander-Stiftung (Sta-81.007.01) durchgeführt.

## F. Summary

Intraspecies hybridomas (rat x rat) and their capability for obtaining monoclonal antibodies against rat gliomas

Out of the fusion of rat myeloma cells (cell line Y<sub>3</sub>Ag1.2.3) and rat splenocytes sensitized against 78FR-G-344 antibodies producing hybridomas had been obtained.

The two evaluated fusions resulted in 73 hybridoma cell cultures, of which 58 produced antibodies.

After cloning, 48 hybridoma clones could be cultivated. The antibodies of these cells made selective bindings with the glioma cells which were used for the immunisation. Crossreactions with different recognition patterns were demonstrated in two of the four tested rat glioma cell lines and in all of the five rabbit glioma cell line.

By means of absorption experiments of culture supernatants (clones 22IC3, 25EC1) with cells of the glioma cell line that had been used for immunisation, it became apparent that the contents of antibodies within the supernatants gradually decreased when increasing numbers of cells for absorption were used. The contents of antibodies had descended below the detection limit by incubating  $10^7$  glioma cells with 100  $\mu$ l of supernatants.

The antibodies of the three tested clones could be classified as IgG.

Selected hybridomas were transplanted into the abdominal cavity of rats, which in some cases were pretreated with Prestane<sup>R</sup>. The concentration of the monoclonal antibodies in ascite fluid taken one week later was considerably higher than the corresponding culture supernatant.

Thus the intraspecies hybridomas proved to be very efficient to further investigations of the nature of the glioma associated antigens.

F. Literaturverzeichnis

- Andersson, J., Melchers, F.: The antibody repertoire of hybrid cell lines obtained by fusion of x63-Ag8 myeloma cells with mitogen-activated B-cell blasts.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 130-139 (1978)
- Ashwood-Smith, M.J.: Preservation of mouse bone marrow at 79°C with dimethylsulfoxide.  
Nature 190, 1204-1205 (1961)
- Ashwood-Smith, M.J.: Radioprotective and cryoprotective properties of DMSO.  
In: Dimethylsulfoxide. S.W. Jacobs; E.E. Rosenbaum; D.C. Wood (Hrsg.) Inc. New York 147-187 (1971)
- Baldwin, R.W., Price, M.R.: Nature and expression of tumour antigens associated with experimental animal and human tumours.  
Ann. clin. Biochim. 13, 488 (1976)
- Barski, G., Sorieul, S., Cornefert, F.: "Hybrid" type cells in combined cultures of two different mammalian cell strains.  
J. Nat. Cancer Inst. 26, 1269-1291 (1961)
- Bazin, H., Beckers, C., Beckers A., Horemans, J.F.: Transplantable immunoglobulin-secreting tumours in rats. I. General features of Lou/Wsl strain rat immunocytomas and their monoclonal proteins.  
Int. J. Cancer, 10, 568-580 (1972)

- Bazin, Hervé: Production of rat monoclonal antibodies with the Lou rat non secreting IR983F myeloma cell line.  
Pergamon Press 1982
- Bechtol, K.B.: Quantitativ absorbtion/blocking assay.  
In: Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds.)  
Monoclonal Antibodies. Plenum Press 1980
- Bilzer, Th., Stavrou, D.: Comparison of cell mediated reactivity against nativ and chemically modified rat glioma cells.  
J. Canc. Res. Clin. Oncol. 99, A 65 (1981)
- Buchmaier, M.J., Lewicky, H.A., Tomori, O., Johnson, K.M.:  
Monoclonal antibodies to lymphocytic choriomeningitis virus react with pathogenic arena viruses.  
Nature 288, 486-487 (1980)
- Burnet, F.M.: The clonal selection therapy of aquired immunity.  
Cambridge University press, Cambridge England (1959)
- Burtonboy, G., Bazin, H., Deckers, C.: Transplantable immunoglobulin-secreting tumors in rats. III. Establish-  
ment of immunoglobulin-secreting cell lines from Lou/  
W<sub>S</sub>L strain rats.  
Europ. J. Cancer 9, 259-262 (1973)
- Carrel, S., de Tribolet, N., Mach, I.P.: Expression of neuro-  
ectodermal antigens common to melanomas, gliomas and  
neuroblastomas.  
Acta Neuropath. 57, 158-164 (1982)

- Coakham, H.B.: Surface antigen(s) common to human astrocytoma cells.  
Nature (Lond.) 250, 328-330 (1974)
- Coakham, H.B., Kornblith, P.L., Quindlen, E.A., Pollok, L.A., Wood, W.C., Harnett, L.C.: Autologous humoral response to human gliomas and analysis of certain cell surface antigens: in vitro study with the use of microcytotoxicity and immune adherence assays.  
J. Nat. Canc. Inst. 64, 223-233 (1980)
- Coakham, H.B., Garson, J.A., Kemshead, J., Harper, E.J., Brownell, B.: Monoclonal antibodies to uncultured human astrocytomas.  
J. Neuroimmunol. 238, 3. (1982)
- Coffino, P., Baumal, R., Laskov, R., Scharff, M.D.: Cloning of mouse myeloma cells and detection of rare variants.  
J. Cell. Physiol. 79, 429-440 (1972)
- Cohn, M.: Natural history of the myeloma.  
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 32, 211 (1967)
- Coons, A.H.: The application of fluorescent antibodies to the study of naturally occurring antibodies.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 69, 658-662 (1957)
- Cornain, S., Carnaud, C., Silverman, D., Klein, E., Rajewsky, M.F.: Spleen cell reactivity against transplanted neurogenic rat tumors induced by ethylnitrosourea: uncovering of tumor specificity after removal of complement receptor bearing lymphocytes.  
Int. J. Cancer 16, 301-311 (1975)

- Cotton, R.G.H., Milstein, C.: Fusion of two immunoglobulin producing myeloma cells.  
Nature 244, 42-43 (1973)
- Cravioto, H.: Immunology of experimental brain tumors.  
In: H. Waters (ed.) The handbook of cancer immunology, Vol. 3, 329-363. New York-London: Garland STPM Press (1978)
- Croce, C.M., Koprowski, H., Eagle, H.: Effect of environmental pH on the efficiency of cellular hybridisation.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1953-1956 (1972)
- Croce, C.M., Linnenbach, A., Hall, W., Steplewski, Z., Koprowski, H.: Production of human hybridomas secreting antibodies to measles virus.  
Nature 288, 488-489 (1980)
- Cuello, Claudio: Monoclonal antibodies to neurotransmitters: potential value in the understanding of normal and abnormal neurological function.  
In: Monoclonal antibodies in clinical medicine. Academic Press, Eds.: McMichael, A.J., Fabre, J.W. (1982)
- Davidson, R.L., Gerald, P.S.: Improved techniques for the induction of mammalian cell hybridisation by polyethylene glycol.  
Somatic Cell Genetics 2, 165-176 (1976)
- Day, E.D., Bigner, D.D.: Specificity, cross-reactivity, and affinity of  $^{125}\text{I}$ -labelled anti-glioma antibodies for monolayers of cultured glioma cells.  
Cancer Res. 33, 2362-2372 (1973)

- Dean, C.J., Gyure, L.A., Styles, I.M., Hobbs, S.M.,  
North, S.M., Hall, J.G.: Production of IgA secreting  
hybridomas: a monoclonal rat antibody of the IgA class  
with specificity for RT1  
J. Immunol. Meth. 53, 307-312 (1982)
- Edwards, P.A.W.: Some properties and applications of  
monoclonal antibodies.  
Biochem. J. 200, (1981)
- Fazekas de St. Groth, S., Scheidegger, D.: Production of  
monoclonal antibodies: Strategy and tactics.  
J. Immunol. Methods 35, 1-21 (1980)
- Fey, H., Pfister, H., Messerli, J., Sturzenegger, N.,  
Grolimund, F.: Methods of isolation, purification  
and quantitation of bovine immunoglobulins.  
Zbl. Vet. Med. B 23, 269-300 (1976)
- Fields, K.L., Gosling, C., Megson, M., Stern, P.L.: New cell  
surface antigens in rat defined by tumors of the ner-  
vous system.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 4, 1296-1300 (1975)
- Galfré, G., Howe, S.C., Milstein, C.: Antibodies to major  
histocompatibility antigens produced by hybrid cell  
lines.  
Nature 266, 550-552 (1977)
- Galfré, G., Milstein, C., Wright, B.: Rat x rat hybrid  
myelomas and a monoclonal anti-Fd portion on mous IgG.  
Nature 277, 131-133 (1979)

- Galfré, G., Butcher, G.W., Howard, I.C., Wilde, C.D.,  
Milstein, C.: Clonal competition and stability of  
hybrid myelomas of mouse and rat origin.  
Transplantation Proc. XII, No. 3, 371-375 (1980)
- Gerhard, W., Croce, C.M., Lopes, D., Koprowski, H.:  
Repertoire of antiviral antibodies expressed by  
somatic cell hybrids.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 1510-1514 (1978)
- Gerhard, W., Yewdell, J., Frankel, M.E., Lopes, A.D.,  
Staudt, L.: Monoclonal antibodies against influenza  
virus.  
Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds.)  
Monoclonal Antibodies, Plenum Press 1980
- Goding, J.W.: Antibody production by hybridomas.  
J. Immunol. Methods 39, 285-308 (1980)
- Harris, H., Watkins, J.F.: Hybrid cells derived from mouse  
and man: Artificial heterokaryons of mammalian cells  
from different species.  
Nature 205, 640-646 (1965)
- Hashimoto, Yoshiyuki, Masuko, Takashi: Hybridoma established  
from spleen cells of a rat immune to syngeneic bladder tumor  
its secretion of monoclonal antibody specific for a  
tumor cell clone in a long-term transplanted bladder  
tumor line  
Gann, 72, 329-330 (1981)
- Hellström, K.E., Hellström, I., Brown, J.P.: Unique and  
common tumor specific transplantation antigens of  
chemically induced mouse sarkomas.  
Int. J. Cancer 21, 317-322 (1978)

- Hellström, K.E., Brown, J.P., Hellström, I.: Monoclonal antibodies to tumor antigens.  
Contemp. Top. Immunobiol. Vol. II (1980)
- Hengartner, H., Luzzati, A.L., Schreier, M.: Fusion of in vitro immunized lymphoid cells with X63-Ag8.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 92-99 (1978)
- Herberman, R.B.: Immunogenicity of tumor antigens.  
Biochem. Biophys. Acta 473, 93-119 (1977)
- Herlyn, D., Herlyn, M., Steplewski, Z., Koprowski, H.:  
Monoclonal antibodies in cell-mediated cytotoxicity against human melanoma and colorectal carcinoma.  
Eur. J. Immunol. 9, 657-659 (1979, )
- Herlyn, M., Steplewski, Z., Herlyn, D., Koprowski, H.:  
Colorectal carcinoma-specific antigen: Detection by means of monoclonal antibodies.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1438-1442 (1979, )
- Herlyn, D., Steplewski, Z., Herlyn, M., Koprowski, H.:  
Inhibition of growth of colorectal carcinoma in nude mice by monoclonal antibody.  
Cancer Res. 40, 717-721 (1980)
- Hirt, P., Cravioto, H.: A new microcytotoxicity assay for in vitro demonstration of cellular immunity in experimental gliomas.  
J. Neuropath. Exp. Neurol. 35, 103 (1976)
- Horibata, K., Harris, A.W.: Mouse myelomas and lymphomas in culture.  
Exp. Cell Res. 60, 61-77 (1970)

- Jonak, L. Zdenka: Isolation of monoclonal antibodies from supernatant by  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  precipitation  
In: Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds.)  
Monoclonal Antibodies, Plenum Press 1980
- Katz, D.H., Benacerraf, B. (eds.): The role of the products of the histocompatibility gene complex in immune-response.  
Acad. Press. New York (1976)
- Kearney, J.F., Radbruch, A., Liesegang, B., Rajewsky, K.:  
A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybridoma cell lines.  
J. Immunol. 123, 1548-1550 (1979)
- Kennett, R.H., Denis, K.A., Tung, A.S., Klinman, N.R.:  
Hybrid plasmacytomaproduction: Fusion with adult spleen cells, monoclonal spleen fragments, neonatal spleen cells and human spleen cells.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 77-91 (1978)
- Kennett, R.H., Gilbert, F.: Hybrid myelomas producing antibodies against a human neuroblastoma antigen present on fetal brain.  
Science 203, 1120-1121 (1979)
- Klebe, R.J., Mancuso, M.G.: Chemicals which promote cell hybridisation.  
Somatic Cell Genetics 7, 473-488 (1981)
- Klinman, N.R., Press, J.L., Sigal, N.H., Gerhart, P.J.:  
The generation of antibody diversity.  
Cunningham A.J. (ed.) Academic Press London 127-149 (1976)

- Knutton, S., Pasternak, C.A.: The mechanism of cell-cell fusion.  
Trends Biochem. Science 4, 220-223 (1979)
- Köhler, G., Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.  
Nature 256, 495-497 (1975)
- Köhler, G., Milstein, C.: Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion.  
Eur. J. Immunol. 6, 511-519 (1976)
- Köhler, G., Howe, S.C., Milstein, C.: Fusion between immunoglobulin secreting and nonsecreting myeloma cell lines.  
Eur. J. Immunol. 6, 292-295 (1976)
- Köhler, G., Shulman, M.J.: Cellular and molecular restrictions of the lymphocyte fusion.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 143-151 (1978)
- Köhler, G.: Immunoglobulin chain loss in hybridoma lines.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2197-2199 (1980)
- Koprowski, H., Steplewski, Z., Herlyn, D., Herlyn, M.: Study of antibodies against human melanoma produced by somatic cell hybrids.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3405-3409 (1978)
- Koprowski, H., Gerhard, W., Wiktor, T., Martinis, J., Shander, M., Croce, C.M.: Anti-viral and anti-tumor antibodies produced by somatic cell hybrids.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 8-19 (1978)
- Koprowski, H., Steplewski, Z., Mitchell, K., Herlyn, D., Herlyn, M., Fuhrer, P.: Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies.  
Somatic Cell Genetics 6, 957-972 (1979)

- Kornblith, P.L., Dohan, F.C., Wood, W.C., Whiteman, B.O.:  
Human astrocytoma serum mediated immunologic response.  
Cancer 33, 1512-1519 (1974)
- Kumar, S., Taylor, G.: Specific lymphocytotoxicity and  
blocking factors in tumors of the central nervous  
system.  
Brit. J. Cancer 28, 135-141 (1973)
- Lefkovits, I.: Introduction of antibody-forming cell clones  
in microcultures.  
Eur. J. Immunol. 2, 360-366 (1972)
- Lehnhardt, W., Anderson, J., Continho, A., Melchers, F.:  
Cloning of murine transformed cell lines in suspension  
culture with efficiencies near 100%.  
Exp. Cell Res. 111, 309-316 (1978)
- Lemonnier, F., Burakoff, S.J., Germain, R.N., Benacerraf, B.:  
Cytolytic thymus-derived lymphocytes for allogenic  
stimulator cells crossreact with chemically modified  
syngeneic cells.  
Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.) 74, 1229-1233 (1977)
- Levy, R., Dilley, J., Lampson, L.A.: Human normal and  
leukemia cell surface antigens. Mouse monoclonal anti-  
bodies as probes.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 164-169 (1978)
- Lim, R., Klusens, L.: Immunological specificity of astrocytoma  
antigens.  
Cancer Res. 32, 1667-1670 (1972)
- Littlefield, J.W.: Selection of hybrids from matings of  
fibroblasts in vitro and their presumed recombinations.  
Science 145, 709 (1964)

- Lostrum, M.K., Stone, M.R., Tam, M., Burnette, W.N.,  
Pinter, A., Nowinski, R.C.: Monoclonal antibodies  
against murine leukemia viruses: Identification of  
six antigenic determinants on the p15(E) and gp70  
envelope proteins.  
Virology 98, 336-350 (1979)
- McKearn, T.J.: Method for growing hybridomas in rats or mice.  
Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds.)  
Monoclonal antibodies, Plenum Press 1980
- Minna, J.D., Cuttita, F., Rosen, S., Bum, P.A., Carney, D.N.,  
Gazdar, A.F., Krasnow, S.: Methods for production of  
monoclonal antibodies with specificity for human lung  
cancer cells.  
In vitro 17, 1058-1070 (1981)
- Mishell, B.B., Shiigi, S.M.: Selected methods in cellular  
immunology.  
Freeman and Company, San Francisco 1980
- Moranz, R.A., Wood, G.W., Foster, M., Clark, M., Gallahan, K.:  
Macrophages in experimental and human brain tumors.  
Part I: Studies of the macrophage content of experimental  
rat brain tumors of varying immunogenicity.  
J. Neurosurg. 50, 298-304 (1979)
- Murali de, B., Diserens, A.C., Carrel, S., Mach, J.P., de  
Tribolet, N.: Neuroectodermal antigens defined by mono-  
clonal antibodies to human gliomas and melanomas.  
J. Neuroimmunol. 3, 242 (1982)
- Murali de, B., de Tribolet, N., Diserens, A.C., Carell, S.,  
Mach, J.P.: Reactivity of antiglioma monoclonal anti-  
bodies for a large panel of cultured gliomas and other  
neuroectoderm derived tumors.  
in press

- Neff, J.M., Enders, S.F.: Poliovirus replication and cytopathogenicity in monolayer hamster cultures fused with beta propiolactone inactivated sendaivirus. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 127, 260-267 (1968)
- Neuwelt, E.A., Clark, W.K.: Clinical aspects of neuroimmunology. 73-119  
Baltimore: Williams and Wilkins 1978
- Nexø, B.A.: A plaque assay for murine leukemia virus using enzyme-coupled antibodies. Virology 77, 849-852 (1977)
- North, Susan M., Styles, J., Hobbs, S.M., Dean, C.J.: Monoclonal antibodies to rat sarcomata. Immunization procedures and source of lymphoid cells for hybridoma production Immunology 47, 397-405 (1982)
- Norwood, T.H., Zeigler, C.J., Martin, G.M.: Dimethyl sulfoxide enhances polyethylene glycol-mediated somatic cell fusion. Somat. Cell Genet. 2, 263-270 (1976)
- Oi, V.T., Jones, P.P., Goding, J.W., Herzenberg, L.A.: Properties of monoclonal antibodies to mouse Ig allotypes H-2, and Ia-antigens. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 115-129 (1978)
- Olsson, L., Kaplan, H.S.: Human-human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined antigenic specificity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, (1980)
- Ouchterlony, Ö.: Diffusions-in-gel methods for immunological analysis II. Progr. Allergy 6, 30-154 (1962)

- Pateraki, E., Guesdon, J.L., Serrie, C., Avrameas, S.:  
Ter-ELISA: The Elisa-test performed in terasaki plates.  
J. Immunol. Methods 46, 361-368 (1981)
- Paul, J.: Zell- und Gewebekulturen.  
De Gryter New York - Berlin 1980
- Pfreundschuh, M., Shiku, H., Takahashi, T., Ueda, R.,  
Oettgen, H.F., Ransohoff, J., Old, L.J.: Serological  
analysis of cell surface antigens of human malignant  
brain tumors.  
Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.) 75, 5122-5126 (1978)
- Pfreundschuh, M., Cravioto, H., Röhrich, M.: Serological  
analysis of cell surface antigens of nitrosourea-  
induced rat gliomas.  
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 99, A 71-A 72 (1981)
- Phillips, J., Sikora, K.: Human monoclonal antibodies to  
gliomas. Workshop on monoclonal antibodies against  
gliomas and other neurectoderm-derived tumors  
Epalinges, Switzerland, 30 March 1982
- Pontecorvo, V.: Production of mammalian somatic cell hybrids  
by means of polyethylene glycol treatment.  
Somat. Cell Genet 1, 397-400 (1975)
- Posner, M.R., Antoniou, D., Griffin, J., Schlossman, S.F.,  
Lazarus, H.: An enzyme linked immunosorbent assay  
(ELISA) for the detection of monoclonal antibodies  
to cell surface antigens on viable cells.  
J. Immunol. Methods 48, 23-31 (1982)
- Potter, M.: Immunoglobulin producing tumors and myeloma  
proteins in mice.  
Phys. Rev. 52, 631-719 (1972)

- Potter, M.: Antigen-binding myeloma proteins of mice.  
Adv. Immunol. 25, 141-211 (1978)
- Rainbird, S., Ridley, A.: Antigenicity of ethylnitroso-  
urea-induced rat schwannomas assayed by in vitro  
lymphocytotoxicity.  
Neuropath. Appl. Neurobiol. 3, 9-14 (1977)
- Ridley, A., Cavanagh, J.B.: Lymphocytic infiltration in  
gliomas: Evidence of possible host resistance.  
Brain 94, 117 (1971)
- Schimmelpfeng, L., Langenberg, U., Peters, H.: Macrophages  
overcome mycoplasma infections of cells in vitro.  
Nature 285, 661-662 (1980)
- Schnegg, J.F., Diserens, A.C., Carrel, S., Accolla, R.S.,  
de Tribolet, N.: Human glioma-associated antigens de-  
tected by monoclonal antibodies.  
Cancer Res. 41, 1209-1213 (1981)
- Schnegg, F.J., de Tribolet, N., Diserens, A.C., Martin-  
Achard, A., Carrel, S.: Characterization of a rabbit  
anti human malignant glioma antiserum.  
Int. J. Cancer 28, 265-269 (1981)
- Schneiderman, S., Faber, L., Baserga, R.: A simple method  
for degreasing the toxicity of polyethyleneglycol in  
mammalian cell hybridisation.  
Som. Cell Genet. 5, 263-269 (1979)
- Secher, D.: Monoclonal antibodies by cell fusion.  
Immunology Today 2, 22-26 (1980)
- Seeger, R.C., Rosenblatt, H.M., Imai, K., Ferrone, S.:  
Common antigenetic determinants on human melanoma,  
glioma, neuroblastoma, and sarcoma cells defined  
with monoclonal antibodies.  
Cancer Res. 41, 2714-2717 (1981)

- Seeger R.C.: Immunodiagnosis and immunotherapy of neuroblastomas with monoclonal antibodies.  
J. Neuroimmunol. 3, 239 (1982)
- Sheikh, K.M., Apuzzo, M.L., Kochsiek, K.R., Weiss, M.H.:  
Malignant glial neoplasms: Definition of a humoral host response to tumor-associated antigen(s).  
Yale J. Biol. Med. 50, 397-403 (1977)
- Shulman, M., Wilde, C.D., Köhler, G.: A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies.  
Nature 276, 269-270 (1978)
- Sikora, K., Alderson, Th., Phillips, J., Watson, J.V.:  
Human hybridomas from malignant gliomas.  
The Lancet 2, 11-14 (1982)
- Singh, G., Bazin, H., Ladoulis, Ch.T.: In vitro synthesis and release of immunoglobulins by thymocytes of inbred rats.  
Molecular Immunology 16, 755-766 (1979)
- Spence, A.M., Hellström, K.E., Hellström, I., v. Belle, G., Sullivan, K., Wahlström, T.: Immunisation against ethylnitrosourea induced autochthonous neurogenic rat tumors.  
Brit. J. Cancer 40, 164-167 (1979)
- Stavrou, D.: Beitrag zur Morphologie und Enzymhistochemie experimenteller Tumoren des Zentralnervensystems der Ratte. I. Morphologische Befunde.  
Acta Neuropath. (Berl.) 15, 220-230 (1970)
- Stavrou, D.: Mögliche immunologische Aspekte bei experimentellen neurogenen Tumoren.  
Zbl. Allg. Path. 120, 535 (1976)

- Stavrou, D., Anzil, A.P., Weidenbach, W., Rodt, H.: Immuno-  
fluorescence study of lymphocytic infiltrations in  
gliomas. Identification of T-lymphocytes.  
J. Neurol. Sci. 33, 275-282 (1977)
- Stavrou, D., Elling, H., Osterkamp, U.: Zytotoxische Anti-  
körper gegen experimentelle Gliome.  
Zbl. Allg. Path. 121, 568 (1977)
- Stavrou, D., Anzil, A.P., Elling, H.: Tumor specific fluores-  
cent and complement dependent cytotoxic antibodies in  
the serum of rats with chemically induced brain gliomas.  
Acta Neuropath. (Berl.) 43, 111-117 (1978a)
- Stavrou, D., Elling, H., Haglid, K.G.: Demonstration of humo-  
ral antibodies against autologous cells in experimental  
rabbit gliomas.  
J. Neuropath. Exp. Neurol. 37, 694 (1978b)
- Stavrou, D., Hultén, M., Anzil, A.P., Bilzer, Th.: The humo-  
ral antibody response of rats immunized with chemically  
modified syngeneic brain cells and glioma cells.  
Int. J. Cancer 26, 629-637 (1980)
- Stavrou, D., Hultén, M., Bilzer, Th.: Chemical modification  
and antigenicity of glioma cells.  
Acta Neuropath. Suppl. VII, 75-78 (1981)
- Stavrou, D., Bilzer, Th., Hultén, M., Zänker, K.S., Anzil, A.P.,  
Haglid, K.G., Dahme, E.: Immunological aspects of ex-  
perimental brain tumors (Review)  
Anticancer Research 2, 151-156 (1982)
- Stavrou, D.; Süß, Chr.; Bilzer, Th., Kummer, U., de Tribolet, N.:  
Monoclonal antibodies reactive with glioma cell lines  
derived from experimental brain tumors.  
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 19, 10 (1983)

- Steele, G.J., Sjögren, H.O.: Crossreacting tumor-associated antigen(s) among chemically induced rat coloncarcinomas. *Cancer Res.* 34, 1801-1807 (1974)
- Suter, L., Brügger, J., Serg, C.: Use of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for screening of hybridoma antibodies against cell surface antigens. *J. Immunol. Methods* 39, 407-411 (1980)
- Tho, B.H., Guli, E.P.G.: In vitro immunoreactivity against ethylnitrosourea induced tumors of the nervous system in rat. *Experientia* 30, 1472-1473 (1974)
- Tribolet de, N., Carrel, S.: Human glioma tumor associated antigen. *Cancer Immunol. Immunother.* 9, 207-211 (1980)
- Tribolet de, N., Muralt de, B., Diserens, A.C.: Reactivity spectrum of monoclonal antibodies to human gliomas. *J. Neuroimmunol.* 3, 239 (1982)
- Trouillas, P.: Carcinofoetal antigen in rat glial tumors. *Lancet* 2, 552 (1971)
- Wahlström, T., Saksela, E., Troupp, H.: Cell bound antigial immunity in patients with malignant tumors of the brain. *Cell Immunol.* 6, 161-170 (1973)
- Wahlström, T., Linder, E., Saksela, E., Westermark, B.: Tumor specific membrane antigens in established cell lines from gliomas. *Cancer* 34, 274-279 (1974)
- Wikstrand, C.J., Mahaley, M.S., Bigner, D.D.: Surface antigenic characteristic of human glial brain tumor cells. *Cancer Res.* 37, 4267-4275 (1977)

- Wikstrand, C.J., Bigner, D.D.: Surface antigens of human glioma cells shared with normal and fetal brain.  
Cancer Res. 39, 3235-3243 (1979)
- Wikstrand, C.J., Bigner, D.D.: Expression of human fetal brain antigens by human tumors of neuroectodermal origin as defined by monoclonal antibodies.  
Cancer Res. 42, 267-275 (1982)
- Wood, G.W.: Immunohistologic evaluation of the lymphoreticular infiltrate of human central nervous system tumors.  
J. Nat. Canc. Inst. 62, 485 (1979)
- Woosley, R.E., Mahaley, M.S.J., Mahaley, J.L., Miller, G.M., Brooks, W.H.: Immunobiology of primary intracranial tumors. Part 3: Microcytotoxicity assays of specific response of brain tumor patients.  
J. Neurosurg. 47, 871-885 (1977)
- Yeh, M.J., Hellström, I., Hellström, K.E.:  
Clonal variation in expression of a human melanoma antigen defined by a monoclonal antibody.  
J. Immunol. 126, 1312-1317 (1981)
- Yelton, D.E., Diamond, B.A., Kwan, S.-P., Scharff, M.D.:  
Fusion of mouse myeloma and spleen cells.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 1-7 (1978)
- Yelton, D.E., Margulies, D.H., Diamond, B., Scharff, M.:  
Plasmacytomas and hybridomas.  
Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds.)  
Monoclonal antibodies, Plenum Press (1980)

Herrn Professor Dr. D. Stavrou möchte ich für die Überlassung des Themas und für die jederzeit gewährte Unterstützung danken.

Frau D. Wallmann war mir bei der Durchführung der Experimente eine wertvolle Hilfe.

Für technische Hilfen danke ich Frau A. Lechner und Herrn S. Lutz.



## Lebenslauf

- 1949 Geboren am 29. März als Tochter des Dipl.-Landwirtes Kurt Steinecke und seiner Ehefrau Magret, Apothekerin, in Nordhausen/Thüringen
- 1955-1963 Besuch der Volksschule an verschiedenen Orten
- 1963-1972 Besuch von Realschule und Gymnasium
- 1972 Abitur am Erasmus-Grasser-Gymnasium in München
- 1972 Immatrikulation an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Studium an der Erziehungswissenschaftlichen Fakultät
- 1975 1. Staatsexamen für das Lehramt an Grund- und Hauptschulen  
Eintritt in den Staatsdienst als Lehramtsanwärterin
- 1975-1976 Berufsausübung an Hauptschulen in Geretsried und Bad Tölz
- 1976-1981 Studium der Tiermedizin an der LMU-München
- 1981 Staatsexamen  
Beginn der vorliegenden Dissertation am Institut für Tierpathologie, Abteilung Funktionelle Pathologie (Prof. Dr. D. Stavrou), der Universität München
- 1982 Approbation als Tierärztin am 18. Januar
- 1982-1983 1. Januar 82 bis 30. Juni 83 Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Tierpathologie, Abteilung Funktionelle Pathologie, der Universität München









